

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2000-513720  
(P2000-513720A)

(43) 公表日 平成12年10月17日 (2000. 10. 17)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 38/55		A 6 1 K 37/64	
31/00	6 0 7	31/00	6 0 7 A
	6 0 9		6 0 9 K
			6 0 9
38/43		C 0 7 K 14/745	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-501082  
(86) (22) 出願日 平成9年6月6日 (1997. 6. 6)  
(85) 翻訳文提出日 平成10年12月7日 (1998. 12. 7)  
(86) 国際出願番号 P C T / D K 9 7 / 0 0 2 5 1  
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 4 7 6 5 1  
(87) 国際公開日 平成9年12月18日 (1997. 12. 18)  
(31) 優先権主張番号 0 8 / 6 6 0 , 2 8 9  
(32) 優先日 平成8年6月7日 (1996. 6. 7)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ  
ブ  
デンマーク国, デーヨー-2880 バグスバ  
エルト, ノボ アレ  
(71) 出願人 ザイモジェネティクス  
アメリカ合衆国, ワシントン 98102, シ  
アトル, イーストレイク アベニュー イー  
スト 1201  
(72) 発明者 ペテルセン, ラルス クリスチャン  
デンマーク国, デーヨー-2970 ホルショ  
ルム, ハベパイ 4  
(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾された第VII因子

(57) 【要約】

第VII因子の触媒活性部位は、血液凝固カスケードを効果的に中断する化合物を生成するために修飾される。その修飾は、第VIIa因子が血漿第X又はIX因子を実質的に活性化できなくする。本発明は、後-虚血性再灌流に関連する心筋損傷を妨げ又は処理し、再灌流の間、局部心筋血流を改良し、そして患者における血管開通性を維持し、又は改良し、並びに血栓形成に対して敏感な血管部位で修飾された第VII因子を局部投与するための新規方法及び第VII因子の前記方法への使用に関する。

**【特許請求の範囲】**

1. 患者における血栓形成を阻害するための方法であって、血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する第VII因子を含んで成る治療的有效用量の組成物を、前記患者における血栓形成に対して敏感な血管部位に局部投与することを含んで成る方法。

2. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターとVII因子との反応を含んで成る請求の範囲第1項記載の方法。

3. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第2項記載の方法。

4. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第3項記載の方法。

5. 前記血栓形成の部位が手術、顕微手術、血管形成又は外傷に関連している請求の範囲第1～4のいずれか1項記載の方法。

6. 患者における血管開通性を維持し、又は改良するための方法であって、血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する第VII因子を含んで成る治療的有效用量の組成物を、低められた開通性に対して敏感な血管部位に局部投与することを含んで成る方法。

7. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第6項記載の方法。

8. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第7項記載の方法。

9. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケ

トン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第8項記載の方法。

10. 前記低められた開通性の部位が手術、顕微手術、血管形成又は外傷に関連している請求の範囲第6～9のいずれか1項記載の方法。

11. 後一虚血性再灌流に関連する心筋損傷を妨げ又は最小にするための組成物の製造のためへの、血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する第VII因子の使用。

12. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第16項記載の使用。

13. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第17項記載の使用。

14. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第18項記載の使用。

15. 前記心筋損傷が、心筋壊死である請求の範囲第16～19のいずれか1項記載の使用。

16. 個人における後一虚血性再灌流に関連する心筋損傷を妨げ又は最小にするための方法であって、血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する薬理学的に許容できる第VII因子を含んで成る組成物を前記個人に投与することを含んで成る方法。

17. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第21項記載の方法。

18. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオ

リド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第22項記載の方法。

19. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第23項記載の方法。

20. 前記心筋損傷が心筋壊死である請求の範囲第21~24のいずれか1項記載の方法。

21. 後一虚血性再灌流の間、局部心筋血流を改良するための組成物の製造のためへの、血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する第VII因子の使用。

22. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第26項記載の使用。

23. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第27項記載の使用。

24. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argク

ロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第28項記載の使用。

25. 個人における後一虚血性再灌流の間、局部心筋血流を改良するための方法であって、血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する薬理学的に許容できる第VII因子を含んで成る組成物を前記個人に投与することを含んで成る方法。

26. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第30項記載の方法。

27. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第31項記

載の方法。

28. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第32項記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****修飾された第VII因子****発明の分野**

本発明は、血栓形成を阻害し、血管開通性を維持し又は改良し、局所心筋血流を改良し、そして後一虚血性再灌流の間、心筋損傷を調節する、修飾された形の第VII因子の新規処理方法及び新規使用に関する。

**発明の背景**

血液凝固は、結果的にフィブリン血餅を生ぜしめる種々の血液成分又は因子の複雑な相互作用から成る過程である。一般的に、凝固“カスケード”として言及されて来た、関与する血液成分は、プロ酵素又はチモーゲン、すなわち活性化因子自体、すなわち活性化された血餅因子の作用によりタンパク質分解酵素に転換される酵素的に不活性なタンパク質である。そのような転換を受けている凝固因子は、一般的に“活性因子”として言及され、そして小文字の“a”接尾語の付加により示される（たとえば第VIIa因子）。

活性化された第X因子（“Xa”）は、プロトロンビンをトロンビンに転換するために必要とされ、そして次にそれはフィブリン血餅の形成における最終段階としてフィブリノーゲンをフィブリンに転換する。第X因子の活性化を促進する2種の系又は経路が存在する。“内因性経路”とは、血漿中にのみ存在する因子の使用によりトロンビン形成を導びくそれらの反応を意味する。一連のプロテアーゼー介在活性化は、第VIIIa因子と共に、第X因子をXaに分解する第IXa因子を生成する。同一のタンパク質分解が、血液凝固の“

外因性経路”において第VIIa因子及びその補因子、すなわち組織因子によりもたらされる。組織因子は、膜結合タンパク質であり、そして血漿中で通常、循環しない。しかしながら、血管破壊に基づいて、それは $\text{Ca}^{2+}$ 及びリン脂質の存在下で第X因子の活性化、又は第IX因子の活性化を触媒するために第VIIa因子と複合体化することができる(Nemerson and Gentry, Biochem. 25:4020-4033(1986))。止血における2種の凝固経路の相対的重要性は不明瞭であるが、最近、第VII因子及び組織因子が血液凝固の調節において中枢的な役割を演じることが見出さ

れている。

第VII因子は、一本鎖チモーゲンとして血液中で循環する微量血漿糖タンパク質である。チモーゲンは触媒的に不活性である(Williamsなど., J.Biol.Chem. 264:7536-7543(1989); Raoなど., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85:6687-6691(1988))。一本鎖第VII因子は、インビトロにおいて第X a 因子、第XII a 因子、第IX a 因子又はトロンビンにより二本鎖第VII a 因子に転換され得る。第X a 因子は、第VII因子の主要な生理学的活性化因子であると思われる。止血に関与するいくつかの他の血漿タンパク質のように、第VII因子は、タンパク質のアミノ末端においてクラスター化される複数のグルタミン酸残基のγ-カルボキシル化のために必要とされる、その活性のためのビタミンKに依存する。それらのγ-カルボキシル化されたグルタミン酸は、リン脂質と第VII因子との金属関連相互作用のために必要とされる。

チモーゲン第VII因子の活性化された二本鎖分子への転換は、分子のほぼ中央に位置する内部ペプチド結合の分解により生じる。ヒト第VII因子において、活性化分解部位は、Arg<sub>152</sub>-Ile<sub>153</sub>に存在する(Hagenなど., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83:2412-2416(1986);Thimなど., Biochem. 27:7785-7793(1988);両者は引用により

本明細書に組込まれる)。ウシ第VII因子は、類似するArg<sub>152</sub>-Ile<sub>153</sub>結合での分解により活性化される(Takeyaなど., J.Biol.Chem.263:14868-14877, 1988)。組織因子、リン脂質及びCaイオンの存在下で、二本鎖第VII a 因子は、制限されたタンパク質分解により第X因子又は第IX因子を急速に活性化する。

患者における凝固カスケードを選択的に阻止することがしばしば必要である。抗凝固剤、たとえばヘパリン、クマリン、クマリンの誘導体、インダンジオン誘導体、又は他の剤が、たとえば腎臓透析の間、又は深静脈血栓症、散在性血管内凝固(DIC)、及び他の医学的疾患の宿主を処理するために使用され得る。たとえば、ヘパリン処理、又はクエン酸塩イオンによる体外処理(アメリカ特許第4,500,309号)は、前記処理の間、凝固を妨げるために透析に使用され得る。ヘパリンはまた、手術を受ける患者における深静脈血栓症の予防にも使用され得る。

しかしながら、ヘパリン及び他の抗凝固剤による処理は、不所望の副作用を有する。入手できる抗凝固剤は一般的に、血餅部位で特異的に作用するよりもむしろ、全身体に作用する。たとえば、ヘパリンは、重度の出血を引き起こすことがある。さらに、約80分の半減期をもって、ヘパリンは血液から急速に浄化されるので、頻繁な投与を必要とする。ヘパリンは抗トロンビンIII (ATIII) のための補因子として作用し、そしてATIIIはDIC処理において急速に消耗されるので、適切なヘパリン投与量を維持することがしばしば困難であり、従ってATIII及びヘパリンレベルの連続したモニターリングを必要とする。ヘパリンはまた、ATIII消耗が極端である場合、効果的でない。さらに、ヘパリンの長期使用はまた、血小板凝集を高め、そして血小板数を減じ、そして骨粗鬆症の進行に関係している。インダンジオン誘導体はまた、毒性副作用も有する。

上に手短く記載された抗凝固剤の他に、いくつかの天然に存在するタンパク質が抗凝固活性を有することが見出されている。たとえば、Reutelingsperger (アメリカ特許第4,736,018号) は、ウシ大動脈及びヒト臍静脈から抗凝固タンパク質を単離した。Makiなど (アメリカ特許第4,732,891号) は、ヒト胎盤由来の抗凝固タンパク質を開示する。さらに、ATIIIが、治療用抗凝固剤として提案されている (Schipperなど, Lancet, 1(8069):854-856(1978):Jordan、アメリカ特許第4,386,025号; Bockなど, アメリカ特許第4,517,294号)。

血管壁における平滑筋細胞(SMC)の増殖は、アテローム硬化症における血管損傷の形成において、血管再構成の後、又は他の血管損傷に応じて、重要な現象である。たとえば、アテローム硬化症の処理は時おり、血管形成法、血管内膜切除又は整復性アテローム切除による、又はアテローム硬化性プラークがカテーテル法(血管形成法)を通して圧縮又は除去され、切開(血管内膜切除)を通して動脈壁から切除され、又は天然又は合成移植片によりバイパスされるバイパス移植手術法による、ブロックされた血管の清浄化を包含する。それらの方法は、血管内皮を除去し、下にある内膜層を攪乱し、そして中間SMCの死をもたらす。この損傷に続いて、数週以内で生じ、そして損傷後、6カ月まで特徴的に生じ、そして内皮層が再確立される場合に停止する、中間SMCの内膜SMCへの増殖及び移動を



伴う。ヒトにおいては、それらの損傷は、約20%の細胞及び80%の細胞外マトリックスから成る。

血管形成法、血管内膜切除又はバイパス移植法により処置された患者の約30%又はそれ以上においては、血栓症及び／又は内膜におけるSMC増殖が血管の再閉塞及び再構成手術の続く失敗を引き起こす。手術に続く血管のこの閉鎖は、再狭窄として知られている。

比較的に低い用量で投与され得、そして従来の抗凝固剤組成物に関連する不所望の副作用を生成しない、抗凝固活性を有する改良された組成物の必要性がまだ当業界に存在する。本発明は、損傷の部位で特異的に作用する抗凝固剤を供給することによってこの必要性を満たし、そしてさらに、他の関連する利点を提供する。

修飾された第VII因子分子は、血管内凝固に関与する種々の状態を処置するためにヒトへの投与のために特に有用である。たとえば、深静脈血栓症及び肺塞栓症は従来の凝固剤により処理され得るが、本明細書に記載される修飾された第VII因子は、同定された高い危険性の患者、たとえば手術を受ける患者又はうっ血性心臓疾患を有する患者における血栓塞栓性合併症の発生を防ぐために使用され得る。さらに、修飾された第VII因子は、組織因子-介在凝固誘発のためのアンタゴニストとしても作用し、従って、トロンビンの生成及びフィブリンの続く沈着を阻止することができる。それ自体、修飾された第VII因子は、たとえば血液凝固、血栓症又は血小板沈着の阻害をもたらす組織因子活性を阻害するために有用である。

修飾された第VII因子分子は、急性血管損傷による内膜過形成又は再狭窄の処置において特に有用である。急性血管損傷は、終生にわたって進行する慢性血管損傷（たとえばアテローム硬化症）に比較して、急速に生じる（すなわち数日又は数カ月にわたって）損傷である。急性血管損傷はしばしば、血管形成、血管内膜切除又はアテローム切除、血管移植片配置又は同様の工程の技法が使用される手術工程、たとえば血管再構成に起因する。過形成はまた、たとえば移植片配置又は器官移植に応答して遅延された応答としても生じる。修飾された第VII因子

はヘパリンよりもより選択的であるので、それは損傷の部位で暴露された組織因子のみと一般的に結合し、そして修飾された第VII因子は他の凝固タンパク質を破壊しないので、深

静脈血栓症の防止のために予防的に使用される場合、ヘパリンよりもより効果的であり、そして出血性合併症をより引き起こさない。

冠状血管疾患の処置における最近の進歩は、冠動脈を通して適切な血管流を再確立するために攻撃性プラーク材料を除去するか又は置換するためへの機械的介入の使用を包含する。複数形の機械的介入、たとえばバルーン血管形成法、整復性アテローム切除、血管ステントの配置、レーザー療法、又はロートブレーターの使用にもかかわらず、それらの技法の有効性は、処置の後6カ月以内に約40%の再狭窄により制限されたままである。

再狭窄は、生物学的過程、たとえば血小板沈着及び血栓形成、走化性及びマイトゲン因子の開放、及び血管平滑筋細胞の拡張された動脈セグメントの内膜中への移動及び増殖の複雑な相互作用に起因すると思われる。

機械的損傷の部位での血小板蓄積の阻害は、ヒト対象における再狭窄の速度を制限することができる。血小板GpIIb/IIIaへのモノクローナル抗体の治療的使用は、ヒト対象における再狭窄のレベルを制限することができる (Califfなど, N.Engl.J.Med., 330;956-961(1994))。抗体は、血小板の表面上のGpIIb/IIIa受容体に結合し、そしてそれにより、血小板蓄積を阻害することができる。このデータは、ヒト冠動脈における機械的損傷の部位での血小板蓄積の阻害が生じる究極的な治療応答のために有益であることを示唆する。血小板蓄積は急性血管損傷の部位で生じるが、それらの部位でのトロンビンの発生は血小板の活性化及びそれらの続く蓄積を引き起こすことがある。

続く例に示されるように、本発明の修飾された第VII因子は細胞表面組織因子に結合することができる。たとえば、DEGR-第VIIa因子は、野生型第VIIa因子と同等か又はそれよりも高い親和性をもって

、細胞表面組織因子を結合する。しかしながら、DEGR-第VIIa因子は酵素活性

を有さず、さらにそれは組織因子に結合し、そして野生型第VII<sub>a</sub>因子のための競争アンタゴニストとして作用し、それにより、トロンビンの発生を導びく凝固の外因性経路として作用する。

組織因子結合を維持する修飾された第VII因子分子は、トロンビンの生成を阻止することによって血管損傷の部位での血小板蓄積、及びフィブリンの続く沈着を阻害する。

急性血管損傷の部位でのトロンビン生成を阻止し、そして血小板沈着を制限するDEGR-第VII因子の能力により、組織因子結合活性を維持するが、しかし第VII<sub>a</sub>因子酵素活性を欠いている修飾された第VII因子分子は、血管再狭窄を阻害するために使用され得る。

修飾された第VII因子を含んで成る組成物は、医薬組成物中に配合される場合、患者の処理のための方法において特に有用であり、ここで前記因子は種々の疾病状態を有する個人の凝固関連状態の処置を提供する。血餅カスケードにおいて組織因子と結合するが、しかし他の因子の活性化を触媒する実質的に減じられた能力を有するそのような修飾された第VII因子分子は、他の抗凝固剤と比較される場合、長い血漿半減期及び相応して長い期間の抗凝固活性を有することができる。対象組成物のための医学的徴候は、抗凝固剤により通常処理される徴候、たとえば深静脈血栓症、肺塞栓症、発作、散在性血管内凝固(DIC)、グラム陰性内毒素血症に関連する肺及び腎臓におけるフィブリン沈着、及び心筋梗塞が存在する。組成物は、機械的血管損傷、たとえばバルーン血管形成、血管内膜切除、整復性アテローム切除、ステント配置、レーザー療法、又はロートブレーターにより引き起こされる損傷に続いて生じるような、又は血管移植、ステント、バイパス移植又は器官移植に続いて生じるような血管再狭窄を阻害するために使用され得る。従って、前記組成物は、

血小板沈着及び関連する疾病を阻害するために使用され得る。従って、凝固、血管再狭窄又は血小板沈着を阻害する方法は、修飾された第VII因子、たとえばSer<sub>344</sub>, Asp<sub>242</sub>及びHis<sub>193</sub>の触媒的トライアド(catalytic triad)における少なくとも1つのアミノ酸置換を有する因子を含んで成る組成物を、凝固、血管再狭窄又

は血小板沈着を効果的に阻害するのに十分な量で患者に投与することを含んで成る。前記方法はまた、組織プラスミノゲン活性化因子又はストレプトキナーゼと共に、DEGR-第VII因子及びFFR-第VII因子を含み、そしてtPA誘発性血栓崩壊を促進できる修飾された第VII因子を投与することを含んで成る、個人における冠動脈の急性閉鎖（たとえば急性心筋梗塞）の処理に使用できる。その修飾された第VII因子は、血栓崩壊剤、たとえば組織プラスミノゲン活性化因子の投与の前、その投与と共に、又はその投与に続いてすぐに投与される。

国際出願WO 92/15686号は、修飾された第VII<sub>a</sub>因子、ポリ核酸及び修飾された第VII<sub>a</sub>因子の生成のための哺乳類細胞系、及び血液凝固を阻害するための、修飾された第VII<sub>a</sub>因子を含んで成る組成物に言及する。

国際出願WO 94/27631号は、血管再狭窄、組織因子活性化、及び血小板沈着を阻害するための方法に言及する。

国際出願WO 96/12800号は、組織プラスミノゲン活性化因子又はストレプトキナーゼと共に修飾された第VII<sub>a</sub>因子を含んで成る組成物を個人に投与することを含んで成る、冠動脈の急性閉鎖の処理方法に言及する。

#### 発明の要約

本発明本、血漿第X又はIX因子を活性化する第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する修飾

された第VII因子を含んで成る組成物の治療的有效用量を、患者における血栓形成に対して敏感な血管部位に局所的に投与することを含んで成る、患者における血栓形成を阻害するための方法に関する。前記血栓形成の部位は、手術、顕微手術、血管形成法、又は外傷に関連している。

本発明はさらに、血漿第X又はIX因子を活性化する第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する修飾された第VII因子を含んで成る組成物の治療的有效量を、低められた開通性に対して敏感な血管部位に局所的に投与することを含んで成る、患者における血管開通性を維持し、又は改良するための方法にも関する。前記血栓形成の部位は、手術、顕微手術、血管形成法、又は外傷に関連している。

本発明はさらに、血漿第X又はIX因子を活性化する第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する薬理学的に許容される修飾された第VII因子を含んで成る組成物を個人に投与することを含んで成る、個人における後一虚血性再灌流に関連する心筋損傷を妨げ又は最少にするための方法にも関する。

本発明はさらに、血漿第X又はIX因子を活性化する第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する薬理学的に許容される修飾された第VII因子を含んで成る組成物を個人に投与することを含んで成る、個人における後一虚血性再灌流の間、局部的心筋血流を改良するための方法にも関する。

好ましい態様においては、第VII因子の修飾は、第VII因子とセリンプロテアーゼインヒビターとの反応を含んで成る。より好ましい観点においては、プロテアーゼインヒビターは、有機リン化合物、弗化スルファニル、ペプチドハロメチルケトン又はアザペプチドである。さらにより好ましい観点においては、プロテアーゼインヒビタ

ーは、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンであり、Phe-Phe-Argクロロメチルケトンが最も好ましい。

本発明はさらに、後一虚血性再灌流に関連する心筋損傷を妨げ又は最少にするための組成物の製造のための、血漿第X又はIX因子を活性化する第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する修飾された第VII因子の使用にも関する。本発明はさらに、後一虚血性再灌流の間、局部的心筋血流を改良するための組成物の製造のための、血漿第X又はIX因子を活性化する第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する修飾された第VII因子の使用にも関する。

本発明は、虚血性再灌流に関連する有害性現象を阻害する方法及び組成物を提供する。組織、器官又は肢節に対する重度の虚血は、血流の低下によるものであ

り、そして外傷、手術操作、又は低められた血圧に関連している。重度の虚血に関連する合併症の1つは、動脈系における組織因子のアップレギュレーションである。組織因子のこの低められた発現は、主に毛細血管床において予備凝固応答を刺激すると思われ、従って、血管内血栓形成を開始し、そして／又は維持する。さらに、後一虚血性心臓の再灌流の間、冠状血管内の内皮細胞によるTFの新たな合成は、再灌流の間、冠状血流の低下を導びき、そして従って、究極的に壊死を受けるであろう虚血性心筋の運命に影響を及ぼす。TF抗原及び予備凝固活性は、安定したアンギナを有する患者に比較して、不安定なアンギナを有する患者から得られたアテローム切除検体において高められる。従って、それらの患者において、不安定なアンギナは、プラーク損傷の結果と

して噴門上部大冠動脈の内皮下組織にTFの暴露により沈着されると思われる。これは、結局は、冠流の続く絶対的な低下を伴って、冠内血栓形成を促進するであろう。

TFはまた、異なる経路での冠流をもたらすことができる。虚血性組織への再灌流に続いて、閉塞性であるか又は非閉塞性である血栓が生成される。動脈床における血栓の形成、及び血栓にそっての血小板の沈着は、組織への虚血の二次生成を導びく。血栓の生成及び血小板の存在は、複数の生物活性因子、たとえば凝固経路から生成される因子、たとえばトロンビン及び第X因子、並びに活性化された血小板から開放される因子の生成及び放出を引き起こすことができる。さらに、それらの因子は、基礎をなす内皮及び平滑筋細胞により、又は隣接する単核細胞、たとえばTNF- $\alpha$  及びIL-1による追加の因子の生成を誘発することができる。さらに、次に、それらの因子は、単球及び好中球結合に関連する種々の付着分子のアップレギュレーションを導びく内皮細胞を活性化することができる。通常、循環血液と接触する内皮細胞は、有意なTF活性を発現しない。一定の環境下で、内皮細胞は、TF様予備凝固活性を発現することによって凝固を積極的に促進することができる。特に、外因的に及び内因的に生成される酸素遊離基(OFR)は、有意な量のTFを合成し、そして発現するために冠状血管系内の内皮細胞を刺激することができる。OFRは、種々の細胞構成成分を攻撃することができる高い反

応性の分子種である。OFRの一気の生成は、虚血の期間の後、流れの回復をもたらし、そしてそれらの酸化剤種は、脂質過酸化に続く特定形の再灌流一介在組織損傷、及び細胞構成成分の他の非可逆的変更を担当する。OFRはまた、組織因子経路インヒビター (TFPI)、すなわち内因性凝固経路を阻害する、内皮細胞により合成されるKunitz型タンパク質の活性を劇的に低める。OFRのこの二重効果

(内皮細胞によるTF発現及びTFPI活性の低下)が、通常の内皮の天然の抗凝固性質を予備凝固状態に変更し、従って、凝固の不所望の血管内活性化を付与する。従って、冠状循環内のOFR一介在TF発現は、後一虚血性再灌流の間、冠状血流の有意な低下をもたらす。内因性凝固経路のその付随する活性化を有する、TFのこのOFR一介在発現は、この現象が特に冠状血栓破壊を受ける急性心筋梗塞を有する患者において、後一虚血性再灌流の病理生理学に対して強い影響を与えるので、重要な結果を有する。

非再流動現象 (no-reflow phenomenon)、すなわち前の虚血性組織の微小血管系への不均等な灌流の欠失が、Krugなど、(Circ.Res. 1966;19:57-62)により最初に記載された。虚血性心筋の運命に影響を及ぼすことができる最も重要な決定因子は、虚血の間の側副流(collateral flow)の量、危険領域の大きさ、及び心筋の酸素要求であると思われる。

過去10年の間、再灌流方策、たとえば冠状血栓破壊、主要な血管形成法、又は両者による急性心筋梗塞を有する患者の処置の概念に強い興味が払われて来た。しかしながら、すべての研究は、梗塞関連動脈の再促進の後、左心室機能の改良性を示さなかった。現在、実質的に多くの患者が、梗塞関連冠状血管床における“遅い流れ”の状態を示している。この状態は、少なくとも死亡率に関しての有益性のほとんど完全な欠失に関係している。それらの遅い流れの状態は、前の虚血性心筋の血管系のすべてに再侵入する血液の無能性により少なくとも一部、引き起こされられると思われる。今や驚くべきことには、FVIIaiが再灌流の間、局部心筋血流に影響を及ぼし、そして早めることが示された。また驚くべきことには、FVIIaiが非再流動の領域における有意な低下をもたらすことが示された。

単球及び好中球の結合及び移行、それらの細胞による生物活性化

合物の放出、たとえば遊離酸素基の生成は、内皮細胞活性化及び損傷のレベルを悪化せしめることがある。究極的には、カスケード現象が阻止されないまま進行する場合、これは全身性合併症、及び複数の器官不全を刺激する可能性を導びくことがある。組織因子／第VII因子結合（たとえばFFR-FVII<sub>a</sub>）のための特定のインヒビターを投与することにより組織因子を阻止することによって、及びそれにより、凝固の内因性経路の開始を阻止することによって、カスケード現象の開始が妨げられ、それにより、虚血／再灌流に関連する有害な現象の程度を調節し、たとえば心筋損傷又は壊死を排除し、又は最少にすることができる。

図面の簡単な説明

図1は、Ser<sub>344</sub>® Ala修飾された第VII因子 DNA配列のための発現

ベクターの構成を示す。使用される記号は次のものを包含する：0-1、アデノウイルス5からの0-1交差単位配列；E、SV40エンハンサー；MLP、アデノウイルス2主要後期プロモーター；SS、一組のスプライス部位；及びpA、後期配向におけるSV40からのポリアデニル化シグナル。

図2は、塩溶液により処理された対照と比較した場合の、血管内膜切除されたヒヒ大動脈上での血栓形成（血小板沈着）に対するDEGR-第VII<sub>a</sub>因子のボラス注入の効果を示す。動脈は、60分間にわたって測定された。DEGR-第VII<sub>a</sub>因子は、急性血管損傷のこの霊長類モデルにおける血小板に富んでいる血栓の進行を有意に阻害した。

図3は、ヒヒ平滑筋細胞が、一定量のFVII<sub>a</sub>（5 nM）の存在下で、高まる濃度のFVII<sub>a</sub>（空白の四角）又はDEGR-FVII<sub>a</sub>（黒の四角）と共にインキュベートされた場合に得られる結果を示す。FX活

性化のレベルが色素形成基質S-2222を用いて測定された。データは、5 nMのFVII<sub>a</sub>のみの存在下で生成される活性に対する百分率として、アミド分解活性として表わされる。

図4は、対照動物と比較しての、頸動脈血管内膜切除及び7～30日間のDEGR-VII<sub>a</sub>による処置に続くヒヒの内膜領域の大きさを示す。



図5は、ヒト損傷及びDEGR-第VII<sub>a</sub>因子による処理に続くヒト大腿動脈の内  
膜+中膜領域に対する内膜領域の比を示し、ここで対照グループは5つの血管を  
包含し、7日の処理は11の血管を試験し、そして30日の処理は2つの血管を試験  
した（n=試験された血管の数）。

図6は、梗塞サイズ（IS）、再流なし（no-reflow）（NR）、危険領域（AR）  
、プロトロンビン時間（PT）及び活性化された部分トロンボプラスチン時間（aP  
TT）を測定するための実験プロトコールを示す。

図7は、3種の処理グループにおける梗塞の危険性領域の百分率として表わさ  
れる、再灌流期間の最後での梗塞サイズ（IS）のプロットを示し、前記3種の処  
理部は、それぞれFFR-第VII<sub>a</sub>因子、第VII<sub>a</sub>因子、及び塩溶液により処理され  
た動物である。個々の棒は、8匹の動物の平均±SDを表わす。

図8は、梗塞の危険性領域の百分率として表わされる、再灌流の最後での再流  
なし（no-reflow）（NR）の領域のプロットを示す。（動物は、それぞれFFR-第  
VII<sub>a</sub>因子、第VII<sub>a</sub>因子及び塩溶液により処理された）。個々の棒は、8匹の動  
物の平均±SDを表わす。

図9は、複数の回帰線等式により個々の動物について計算された予測される再  
流なし（no-reflow）（左心室の百分率として）と実際に観察された逆流なし（L  
Vの百分率として）との間の関係を示す。

図10は、20分の虚血、及び10分及び2時間の再灌流後に評価される虚血性心筋  
についての局所心筋血流（RMBF）のプロットを示す。

図11は、プロトロンビン時間（PT）及び活性化された部分トロンボプラスチン  
時間（aPTT）に対するFFR-第VII<sub>a</sub>因子及び第VII<sub>a</sub>因子の効果を示す。

#### 特定の態様の記載

修飾された第VII因子は、チモーゲンの形（すなわち一本鎖分子）で存在する  
ことができ、又はその活性化部位で分解され得る。従って、“修飾された第VII  
因子”とは、組織因子と結合し、そして第IX~IX<sub>a</sub>因子及び第X又はX<sub>a</sub>因子の  
活性化を阻害する修飾された第VII因子及び修飾された第VII<sub>a</sub>因子分子を包含す  
ることを意味する。第VII因子配列は少なくとも1つのアミノ酸修飾を有し、こ

ここでこの修飾は、血漿第X又はIX因子の活性化を触媒する活性化された第VII因子の能力を実質的に減じるために選択され、そして従って、血餅形成活性を阻害することができる。修飾された第VII因子は、少なくとも1つのアミノ酸置換により修飾された活性部位を有し、そしてその修飾された形で、組織因子を結合することができる。修飾された第VII因子組成物は典型的には、実質的に純粋な形で存在する。

ヒト及びウシ第VII因子の好ましい態様においては、活性部位残基Ser<sub>344</sub>が修飾され、Gly, Met, Thr又はより好ましくはAlaにより置換される。そのような置換は、His<sub>193</sub>及びAsp<sub>242</sub>を包含する触媒トリアド(catalytic triad)において、別々に又は他の部位での置換と組合せて行なわれ得る。

修飾された第VII因子の組成物は、凝固カスケードを阻害するために、種々の哺乳類、特にヒトへの投与のために適切である。修飾された第VII因子は、他の抗凝固化合物と共に、又はその代わりに患者

に投与され得る。典型的には、ヒトへの投与のためには、医薬組成物は、修飾されたヒト第VII因子タンパク質、及び医薬的に許容できるキャリアー及び緩衝液を含んで成るであろう。

第VII因子は、凝固カスケード、特に、外因性経路を包含する凝固カスケードにおいて重要な役割を演じる。組織因子及びカルシウムイオンと共に、不活性一本鎖チモーゲンタンパク質として循環血漿に存在する第VII<sub>a</sub>因子は、いったん活性化されると、第X～X<sub>a</sub>因子を活性化し、そして第IX～IX<sub>a</sub>因子を活性化し、結果的にフィブリン血餅の形成を行う。

第VII因子タンパク質は、組織因子に結合する能力を保持しながら、第VII<sub>a</sub>因子の触媒活性を低めるために修飾された触媒部位を有する。修飾された第VII因子分子は、組織因子への結合について生来の第VII及び／又はVII<sub>a</sub>因子と競争する。結果として、第X及びIX因子の活性化が阻害される。

修飾された第VII因子は、それぞれビタミンK-依存性血漿タンパク質のプレプロペプチド及びglaドメイン、並びにglaドメインを欠く第VII因子タンパク質をコードする2種の作用可能に連結された配列コード領域を含んで成るポリヌ

クレオチド分子によりコードされ得、ここで、発現に際し、前記ポリヌクレオチドは、血漿第X又はIX因子を有意に活性化しないが、しかし組織因子を結合することができる修飾された第VII因子分子をコードする。このポリヌクレオチドにより発現される修飾された第VII因子分子は、生物学的活性抗凝固剤であり、すなわちそれは凝固カスケード及び従って、フィブリン沈着又は血餅の形成を阻害することができる。修飾された第VII因子を発現するためには、ポリヌクレオチド分子が、哺乳類細胞系、たとえばBHK、BHK570又は293細胞系中にトランスフェクトされる。

第VII a 因子の触媒活性は、触媒中心又はトリアド(triad)の化学的誘導体化により阻害され得る。誘導体化は、第VII因子と不可逆的インヒビター、たとえば有機リン化合物、弗化スルホニル、ペプチドハロメチルケトンもしくはアザペプチドとの反応により、又はアシル化により達成され得る。好ましいペプチドハロメチルケトンは、PPACK (D-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン；アメリカ特許第4,318,904号を参照のこと；引用により本明細書に組込まれる)、D-Phe-Phe-Arg及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトン(FFR-cmk)；並びにDEGRCK (ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン)を包含する。

第VII a 因子の触媒活性はまた、アミノ酸を置換し、挿入し、又は欠失することによっても阻害され得る。好ましい態様においては、アミノ酸置換は、第VII a 因子触媒部位に寄与するアミノ酸を含む領域として本明細書において定義される、第VII因子触媒トリアドのアミノ酸配列において行なわれる。触媒トリアドにおける置換、挿入又は欠失は一般的に、触媒部位を形成するアミノ酸で又はそのアミノ酸に隣接して存在する。ヒト及びウシ第VII因子タンパク質においては、触媒“トリアド”を形成するアミノ酸は、Ser<sub>344</sub>、Asp<sub>242</sub>及びHis<sub>193</sub>（下付きの数字は、配列における位置を示す）である。他の哺乳類種からの第VII因子における触媒部位は、現在入手できる技法、たとえば中でも、タンパク質単離及びアミノ酸配列分析の技法を用いて決定され得る。触媒部位はまた、他のセリンプロテアーゼ、特にキモトリプシン（その活性部位はこれまで決定されている）の配列と並べ (Siglerなど., J.Mol.Biol., 35:143-164 (1968)；引用により本

明細書に組込まれる)、そして次に、前記の配列の並びから類似する活性部位残基を決定することによっても決定され得る。

アミノ酸置換、挿入又は欠失は、第X及び/又はIX因子の第VII<sub>a</sub>因子による活性化を妨げ、又は阻害するために行なわれる。しかしながら、そのようにして修飾された第VII因子はまた、凝固カスケードにおいて組織因子との結合について真正な第VII及び/又はVII<sub>a</sub>因子と競争する能力を保持すべきである。そのような競争は、本明細書に記載されるような血餅形成アッセイ、又はたとえば細胞表面組織因子を有する細胞系、たとえばヒト膀胱癌細胞系J 82を用いての競争結合アッセイの手段により容易に決定され得る (Sakaiなど., J.Biol.Chem., 264: 9980-9988 (1989) ; 引用により本明細書に組込まれる。

第VII因子において触媒部位を形成するアミノ酸、たとえばヒト及びウシ第VII因子におけるSer<sub>344</sub>, Asp<sub>242</sub>及びHis<sub>193</sub>が、置換され、又は欠失され得る。本発明においては、単一のアミノ酸のみを変更することが好ましく、従って、分子の抗原性を高め、又は組織因子と結合する能力を阻害する可能性を最少にすることが好ましいが、しかしながら、複数のアミノ酸変更(置換、付加又は欠失)が行なわれ得、そして置換、付加及び欠失の組合せもまた行なわれ得る。ヒト及びウシ第VII因子のための好ましい態様においては、Ser<sub>344</sub>は好ましくは、Alaにより置換されるが、しかしGly, Met, Thr又は他のアミノ酸によっても置換され得る。GluによりAspを置換し、そしてLys又はArgによりHisを置換することが好ましい。一般的に、置換は、できるだけタンパク質の三次構造を破壊しないように選択される。引用により本明細書に組込まれるDayhoffなど.(Atlas of Protein Structure 1978, Nat'l Biomed.Res.Found., Washington, D.C.)のモデルは、他のアミノ酸置換の選択のガイドとして使用され得る。ヒト、ウシ又は他の種の適切な第VII因子配列の触媒部位に上記のような残基変更を導入することができ、そして上記の

ような触媒活性の阻害及び得られる抗凝固活性の所望レベルについて得られるタンパク質を試験することができる。修飾された第VII因子に関しては、触媒活性

は、実質的に、その対応する種の野生型第VII因子の触媒活性の約5%以下、より好ましくは約1%以下に阻害されるであろう。

修飾された第VII因子は、組換えDNA技法の使用を通して生成され得る。一般的に、クローン化された野生型第VII因子DNA配列が、所望のタンパク質をコードするように修飾される。次に、この修飾された配列が発現ベクター中に挿入され、そのベクターを用いて、宿主細胞を形質転換し、又はトランスフェクトする。高等真核細胞、特に培養された哺乳類細胞が宿主細胞として好ましい。ヒト第VII因子についての完全なヌクレオチド及びアミノ酸配列は知られている。引用により本明細書中に組込まれるアメリカ特許第4,784,950号を参照のこと（ここで、組換えヒト第VII因子のクローニング及び発現が記載されている）。ウシ第VII因子配列は、Takeyaなど、J.Biol.Chem. 263.14868-14872(1988)(引用により本明細書に組込まれる)に記載されている。

アミノ酸配列の変更は、種々の技法により達成され得る。DNA配列の修飾は、部位特異的突然変異誘発により行なわれ得る。部位特異的突然変異誘発についての技法は、当業界において良く知られており、そしてたとえば、Zoller and Smith(DNA 3:479-488, 1984)により記載されている。従って、第VII因子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を用いて、選択した変更を導入することができる。

そのようにして修飾された第VII因子は、ビタミンK-依存性血漿タンパク質第IX因子、第X因子、プロトロンビン、プロテインC、プロテインS又はプロテインZの1つのglaドメインにより置換されたアミノ末端部分(glaドメイン)を有するタンパク質を包含する

。ビタミンK-依存性血漿タンパク質のglaドメインは、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸残基の存在により特徴づけられ、そして一般的には、それぞれの遺伝子におけるエキソン-イントロン境界の位置に対応するC-末端を有する、長さ約30～約40個のアミノ酸である。異種glaドメインを伴う第VII因子の製造方法は、アメリカ特許第4,784,950号（引用により本明細書に組込まれる）に開示されている。

修飾された第VII因子の生成への使用のためのDNA配列は典型的には、宿主細胞

から適切な翻訳後プロセッシング（たとえば、グルタミン酸残基の $\gamma$ -カルボキシル化）及び分泌を得るために、第VII因子のアミノ末端でプレプロペプチドをコードするであろう。そのプレプロペプチドは、第VII因子、又は他のビタミンK-依存性血漿タンパク質、たとえば第IX因子、第X因子、プロトロンビン、プロテインC又はプロテインSのペプチドであり得る。当業者により理解されるように、追加の修飾が、修飾された第VII因子のアミノ酸配列において行なわれ得、ここでそれらの修飾は、抗凝固剤として作用するタンパク質の能力を有意にそこなわない。たとえば、触媒トリアドにおいて修飾された第VII因子はまた、引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第5,288,629号に一般的に記載されるように、チモーゲン第VII因子のその活性化された二本鎖形への転換を阻害するために活性化切断部位においても修飾され得る。

修飾された第VII<sub>a</sub>因子の発現への使用のための発現ベクターは、クローン化された遺伝子又はcDNAの転写を指令することができるプロモーターを含んで成るであろう。培養された哺乳類細胞への使用のための好ましいプロモーターは、ウィルスプロモーター及び細胞プロモーターを包含する。ウィルスプロモーターは、SV40プロモーター(Subramaniなど., Mol.Cell.Biol. 1:854-864, 1981)及びC

MYプロモーター(Boshartなど., Cell 41:521-530, 1985)を包含する。特に好ましいウィルスプロモーターは、アデノウィルス2からの主要後期プロモーターである(Kaufman and Sharp, Mol.Cell.Biol. 2:1304-1319, 1982)。細胞プロモーターは、マウスカッパ遺伝子プロモーター(Bergmanなど., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81:7041-7045, 1983)及びマウスV<sub>H</sub>プロモーター(Lohなど., Cell 33:85-93, 1983)を包含する。特に好ましい細胞プロモーターは、マウスメタロチオネイン-1プロモーター(Palmiterなど., Science 222:809-814, 1983)である。発現ベクターはまた、プロモーターから下流に及び第VII因子配列自体のための挿入部位から上流に位置する一組のRNAスプライス部位を含むことができる。好ましいRNAスプライス部位は、アデノウィルス及び/又は免疫グロブリン遺伝子から得られる。挿入部位の下流に位置するポリアデニル化部位もまた、発現ベクターに含まれる。特に好ましいポリアデニル化シグナルは、SV40からの初期又は

後期ポリアデニル化シグナル(Kaufman and Sharp、前記)、アデノウイルス 5' E1 b領域からのポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン遺伝子ターミネーター(De Notoなど., Nuc.Acids Res. 9:3719-3730, 1981)、又はヒト第VII因子遺伝子又はウシ第VII因子遺伝子からのポリアデニル化シグナルを包含する。発現ベクターはまた、非コードウィルスリーダー配列、たとえばプロモーターとRNAスプライス部位との間に位置するアデノウィルストリアドリーダー；及びエンハンサー配列、たとえばSV40エンハンサーを包含することができる。

クローン化されたDNA配列は、たとえばリン酸カルシウム介在トランスフェクション(Wiglerなど., Cell 14:725-732, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981; Graham and Van den Eb, Virology 52d:456-467, 1973)、又はエ

レクトロポレーション(Neumannなど., EMBO J. 1:841-845, 1982)により培養された哺乳類細胞中に導入される。外因性DNAを発現する細胞を同定し、そして選択するために、選択表現型(選択マーカー)を提供する遺伝子が一般的に、注目の遺伝子又はcDNAと共に細胞中に導入される。好ましい選択マーカーは、薬物、たとえばネオマイシン、ヒグロマイシン及びメトトレキセートに対する耐性を付与する遺伝子を包含する。選択マーカーは増幅できる選択マーカーであることができる。好ましい増幅できる選択マーカーはジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)配列である。選択マーカーは、Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA; 引用により本明細書に組込まれる)により概説されている。選択マーカーの選択は、当業者のレベルの範囲内である。

選択マーカーは、注目の遺伝子と同時に別々のプラスミド上の細胞中に導入され得、又はそれらは同じプラスミド上に導入され得る。同じプラスミド上に存在する場合、選択マーカー及び注目の遺伝子は異なるプロモーター又は同じプロモーターの制御下で存在し、後者の配置がジストロン情報を生成する。このタイプの構造体は当業界において知られている(たとえば、Levinson and Simonsen、アメリカ特許第4,713,339号)。細胞中に導入される混合物に“キャリアーDNA”として知られる追加のDNAを付加することもまた好都合である。

細胞がDNAを取り込んだ後、それらは適切な増殖培地において、典型的には1～2日間増殖され、注目の遺伝子が発現され始める。本明細書において使用される場合、用語“適切な増殖培地”とは、細胞の増殖及び修飾された第VII因子遺伝子の発現のために必要とされる栄養物及び他の成分を含む培地を意味する。培地は一般的に、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、必須糖、ビタミン、塩、リン脂質

、タンパク質及び成長因子を含む。 $\gamma$ -カルボキシル化された修飾された第VII因子の生成のためには、培地は、ビタミンKを、好ましくは0.1mg/ml～約5mg/mlの濃度で含むであろう。次に、薬物選択が、安定した態様で選択マーカを発現する細胞の増殖のための選択に適用される。増殖できる選択マーカによりトランスフェクトされた細胞のために、薬物濃度がクローン化された配列の高められたコピー数を選択するために高められ、それにより、発現レベルが高められる。次に、安定してトランスフェクトされた細胞のクローンが、修飾された第VI因子の発現のためにスクリーニングされる。

好ましい哺乳類細胞系は、COS-1 (ATCC CRL 1650)、子供ハムスター腎臓(BHK)及び293 (ATCC CRL 1573;Grahamなど., J.Gen.Viro1. 36:59-72, 1977) 細胞系を包含する。好ましいBHK細胞系は、tk<sup>-</sup> ts13 BHK細胞系であり (Waechter and Baserga, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79:1106-1110, 1982;引用により本明細書中に組込まれる)、この後、BHK570細胞と称される。このBHK570細胞系は、ATCC 受託番号CRL 10314として、American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852に寄託されている。tk<sup>-</sup> ts13 BHK細胞系はまた、受託番号CRL 1632としてATCCから入手できる。さらに、多くの他の細胞系、たとえばラットHepI (ラット肝癌; ATCC CRL 1600)、ラットHepII (ラット肝癌; ATCC CRL 1548)、TCMK (ATCC CCL 139)、ヒト肺 (ATC CHB 8065)、NCTC 1469(ATCC CCL 9.1)、CHO (ATC CCCL 61) 及びDUKX細胞 (Urlaub and Chasin, Proc.Natl.Acad. Sci.USA 77:4216-4220,1980) が、使用され得る。

トランスジェニック動物技法が、修飾された第VII因子を生成するために使用され得る。雌の宿主哺乳類の乳腺内でタンパク質を生成



することが好ましい。乳腺における発現及びそれに続く注目のタンパク質のミルク中への分泌は、他の源からのタンパク質を単離することにおいて遭遇する多くの困難性を克服する。ミルクは容易に収集され、多量に入手でき、そして生化学的に十分に特徴づけられる。さらに、主要ミルクタンパク質は、高濃度（典型的には約1～15 g/l）でミルクに存在する。

商業的観点から、宿主として、多量のミルク生成量を有する種を用いることが明らかに好ましい。小動物、たとえばマウス及びラットは使用され得（そして主要段階の証明で好ましい）るが、家畜哺乳類、たとえばブタ、ヤギ、羊及び牛（但し、それらだけには限定されない）を用いることが好ましい。羊は、この種におけるトランスジェネシスのこれまでの歴史、ミルク生成、費用、及び羊のミルクの収集のための装置の容易な入手性のような要因のために、特に好ましい。宿主種の選択に影響を及ぼす要因の比較のためには、WIPO公開WO 88/00239を参照のこと。乳等使用のために飼育された宿主動物、たとえばEast Friesland羊の品種を選択し、又は後日でのトランスジェニック系の飼育により酪農用家畜を導入することが一般的に所望される。いずれにせよ、既知の良好な健康状態の動物が使用されるべである。

乳腺における発現を得るためには、ミルクタンパク質遺伝子からの転写プロモーターが使用される。ミルクタンパク質遺伝子は、カゼイン（アメリカ特許第5,304,489号を参照のこと；引用により本明細書に組込まれる）、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、及びホエイ酸性タンパク質をコードするそれらの遺伝子を包含する。 $\beta$ -ラクトグロブリン(BLG)プロモーターが好ましい。羊 $\beta$ -ラクトグロブリン遺伝子の場合、前記遺伝子の5'フランキング配列の少なくとも近位406bpの領域が一般的に使用されるが、5

'フランキング配列の約5 kbpまでのより大きな部分、たとえば5'フランキングプロモーター、及び $\beta$ -ラクトグロブリン遺伝子の非コード部分を包含する約4.25kbpのDNAセグメントも好ましい。Whitelawなど., Biochem.J. 286:31-39(1992)を参照のこと。他の種からのプロモーターDNAの類似するフラグメントもまた適切である。

$\beta$ -ラクトグロブリン遺伝子の他の領域もまた、発現されるべき遺伝子のゲノム領域のように、構造体に組込まれ得る。イントロンを欠いている構造体は、たとえばそのようなDNA配列を含む構造体に比較して、良好に発現しないことは当業界において一般的に許容されている (Brinsterなど., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85:836-840(1988); Palmiterなど., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88:478-482 (1991); Whitelawなど., Transgenic Res. 1:3-13(1991); WO 89/01343; 及び WO 91/02318 (それらは、引用により本明細書中に組込まれる) を参照のこと)。これに関して、注目のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の生来のイントロンのすべて又はいくらかを含むゲノム配列を使用することが、可能な場合、一般的に好ましく、従って、たとえば $\beta$ -ラクトグロブリン遺伝子からの少なくともいくらかのイントロンのさらなる包含が好ましい。1つのそのような領域は、羊 $\beta$ -ラクトグロブリン遺伝子の3' 非コード領域からのイントロンスプライシング及びRNAポリアデニル化を提供するDNAセグメントである。遺伝子の天然の3' 非コード配列が置換される場合、この羊 $\beta$ -ラクトグロブリンセグメントは、興味あるタンパク質又はポリペプチドの発現レベルを増強し、そして安定化することができる。他の態様においては、修飾された第VII因子配列の開始ATGを囲む領域が、ミルク特異的タンパク質遺伝子からの対応する配列により置換される。そのような置換は、発

現を増強するために推定上の組織特異的開始環境を提供する。完全な修飾された第VII因子プロンプト及び5' 非コード配列を、たとえばBLG遺伝子により置換することが便利であるが、但しより小さな領域も置換され得る。

トランスジェニック動物における修飾された第VII因子の発現のためには、修飾された第VII因子をコードするDNAセグメントが、発現単位を生成するためにその発現のために必要とされる追加のDNAセグメントに作用可能に連結される。そのような追加のセグメントは、上記プロモーター、及び転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を提供する配列を含む。発現単位はさらに、修飾された第VII因子をコードするセグメントに作用可能に連結される分泌シグナル配列をコードするDNAセグメントを含むであろう。分泌シグナル配列は、生来の第VII因子分泌シグ

ナル配列であり、又は他のタンパク質、たとえばミルクタンパク質の配列であり得る。たとえば、von Heinje, Nuc.Acids Res. 14:4683-4690(1986);及びMeadeなど., アメリカ特許第4,873,316号（それらは、引用により本明細書に組込まれる）を参照のこと。

トランスジェニック動物への使用のための発現単位の構成は、修飾された第VI因子配列を、追加のDNAセグメントを含むプラスミド又はファージベクター中に挿入することによって便利に行なわれるが、但し発現単位は、連結のいずれかの配列によっても構成され得る。ミルクタンパク質をコードするDNAセグメントを含むベクターを供給し、そして前記ミルクタンパク質のためのコード配列を修飾された第VII因子ポリペプチドの配列により置換することが特に便利であり、それにより、ミルクタンパク質遺伝子の発現制御配列を含む遺伝子融合体を創造する。いずれにせよ、プラスミド又は他のベクターにおける発現単位のクローニングは、修飾された第VII因子配

列の増幅を促進する。増幅は便利には、細菌（たとえば、E. コリ）宿主細胞において実施され、従って、ベクターは典型的には、複製の起点、及び細菌宿主細胞において機能的な選択マーカを含むであろう。

次に、発現単位が、選択された宿主種の受精卵（初期段階の胚を包含する）中に導入される。異種DNAの導入は、いくつかの経路の1つ、たとえばマイクロインジェクション（たとえば、アメリカ特許第4,873,191号）、レトロウィルス感染（Jaenisch, Science 240:1468-1474(1988)）、又は胚の幹細胞（ES）を用いての特定部位の組込み（Bradleyなど., Bio/Technology 10:534-539(1992)）により達成され得る。次に、卵が偽妊娠雌の卵管又は子宮中に移植され、そして一定期間、増殖される。それらの生殖系に導入されたDNAを担持する子孫は、通常のメンデルの法則に従って、それらの子孫にDNAを伝達することができ、トランスジェニック集団の成長を可能にする。

トランスジェニック動物を作製するための一般的な方法は、当業界において知られている。たとえばHoganなど., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simonsなど., Bio/Technology

gy 6:179-183(1988); Wallなど., Biol.Reprod. 32:645-651(1985); Buhlerなど., Bio/Technology 8:140-143(1990); Ebertなど., Bio/Technology 9:835-838(1991); Krimpenfortなど., Bio/Technology 9:844-847(1991); Wallなど., J.Cell Biol.Biochem. 49:113-120(1992); アメリカ特許第4,873,191号及び第4,873,316号; WIPO公開WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757, 及びGB 87/00458 (それらは引用により本明細書に組込まれる) を参照のこと。外来性DNA配列を哺乳類及びそれらの生殖細胞中に導入するための技法は、

最初、マウスにおいて開発された。たとえば、Gordonなど., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:7380-7384(1980); Gordon and Ruddle, Science 214:1244-1246(1981); Palmiter and Brinster, Cell 41:343-345(1985); Brinsterなど., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82:4438-4442(1985); 及びHoganなど (前記) を参照のこと。それらの技法は、大きな動物、たとえば家畜種への使用のために続いて適合された (たとえば、WIPO公開WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; 及びSimonsなど., Bio/Technology 6:179-183(1988)を参照のこと)。要約すると、トランスジェニックマウス又は家畜の作製において今日使用される最とも効果的な経路においては、注目のDNAの数百の線状分子が、確立された技法に従って、受精卵の前核の1つに注入される。接合体の細胞質中へのDNAの注入もまた使用され得る。

トランスジェニック植物における生産もまた使用され得る。発現は、特定の器官、たとえば塊茎に対して一般化され、又は方向づけられ得る。Hiatt, Nature 344:469-479(1990); Edelbaumなど., J.Interferon Res. 12:449-453(1992); Simonsなど., Bio/Technology 8:217-221(1990); 及びヨーロッパ特許出願EP 255,378を参照のこと。

修飾された第VII因子は、抗-第VII因子抗体カラム上でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製され得る。Wakabayashiなど., J.Biol.Chem. 261:11097-11108(1986) 及びThimなど., Biochem. 27:7785-7793(1988) (それらは引用により本明細書に組込まれる) により記載されるように、カルシウム-依存性モノクローナル抗体の使用が特に好ましい。追加の精製は、従来の化学精製手段、た

たとえば高性能液体クロマトグラフィーにより達成され得る。クエン酸バリウム沈殿を包含する他の精製方法は当業界において知ら

れており、そして本明細書に記載される新規の修飾された第VII因子の精製に適用され得る（一般的には、Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982を参照のこと）。少なくとも約90~95%の均質性の実質的に純粋な修飾された第VII因子が好ましく、そして98~99%又はそれ以上の均質性の第VII因子が、医薬用途のために最も好ましい。部分的に又は所望のような均質性に精製されると、その修飾された第VII因子は治療的に使用され得る。

修飾された第VII因子は、その活性化部位で切断され、その二本鎖形に転換される。活性化は、当業界において知られている方法、たとえばOsterudなど., Biochemistry 11:2853-2857(1972); Thomas、アメリカ特許第4,456,591号; Hedner and Kisiel, J.Clin.Invest. 71:1836-1841(1983);又はKisiel and Fujikawa, Behring Inst.Mitt. 73:29-42(1983)(それらは引用により本明細書に組込まれる)により開示される方法に従って行なわれ得る。次に、得られる分子が下記のようにして配合され、そして投与される。

#### 組成物

化合物は典型的には、介入 (intervention) を実施する前、約24時間以内に投与され、そしてその後、7日間ほどの間、投与されるであろう。心筋損傷を妨げ又は最少にするための投与は、さらに本明細書に記載されるように種々の経路によって行なわれ得る。化合物はまた、血栓形成可能な血管部位で、たとえば吻合の部位で局部的に、又は低められた開通性に対して敏感な血管部位で局部的に投与され得る。

心筋損傷の防止及び処置においては、修飾された第VII因子の投与量は、患者の体重及び病状の重症度に依存して、70kgの患者のために、約50mg~500mg/日、より典型的には1mg~200mg/日、そしてより好ましくは10mg~約175mg/日の範囲である。

心筋損傷の処置のための医薬組成物は、予防及び/又は治療処置のためには、

非経口投与のために意図される。好ましくは、医薬組成物は、非経口的に、すなわち静脈内、皮下又は筋肉内投与される。非経口投与のための組成物は、許容できるキャリアー、好ましくは水性キャリアーに溶解された、修飾された第VII因子分子の溶液を含んで成る。種々の水性キャリアー、たとえば水、緩衝水、0.4%塩溶液、0.3%グリシン及び同様のものが使用され得る。修飾された第VII因子分子はまた、損傷の部位への供給又は標的化のためにリボソーム調製物中に配合され得る。リボソーム調製物は一般的に、たとえばアメリカ特許第4,837,028号、第4,501,728号及び第4,975,282号（それらは引用により本明細書に組込まれる）に記載される。組成物は従来の良く知られている殺菌技法により殺菌され得る。得られる水溶液は、使用のために包装され、又は無菌条件下で濾過され、そして凍結乾燥され、その凍結乾燥された調製物は、投与の前、無菌水溶液と共に組合される。組成物は、おおよその生理学的条件のために必要とされるような医薬的に許容できる補助物質、たとえばpH調節及び緩衝剤、張度調節剤及び同様のもの、たとえば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、等を含むことができる。それらの配合物における修飾された第VII因子の濃度は広く変化し、すなわち約0.5重量%、通常、約1重量%又は少なくとも約1重量%～15又は20重量%ほどであり、そして選択された投与の特定の態様に従って、流体体積、粘度、等により主として選択されるであろう。

従って、静脈内注入のための典型的な医薬組成物は、250mlの無菌リンガー溶液及び10mgの修飾された第VII因子を含むように製造され得る。非経口投与できる化合物を調製するための実際の方法は、当業者に知られており、又は明らかであり、そしてたとえば、Remi

ngton's Pharmaceutical Science, 16th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA(1982)(引用により本明細書に組込まれる)により詳細に記載される。

修飾された第VII因子分子を含む組成物は、予防及び／又は治療処置のために投与され得る。治療的適用においては、組成物は、上記のように、疾病をすでに有する患者に、前記疾病及びその合併症を治し又は少なくとも部分的に阻止するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適切な量は、“治療的有效量”

として定義される。この使用のために有効な量は、疾病又は損傷の重症度、及び患者の体重及び一般的な状態に依存するが、しかし一般的には、70kgの患者に関して、約0.05mg～約500mgの修飾された第VII因子／日の範囲であり、そして約1.0mg～約200mgの修飾された第VII因子／日の投与量がより通常には使用される。本発明の材料は一般的に、重度の疾病又は損傷状態、すなわち生命一脅威又は潜在的な生命脅威の状況において使用され得る。そのような場合、ヒトにおいての外来性物質の最少化及び修飾されたヒト第VII因子の免疫性の一般的な欠失の観点においては、実質的に過剰量のそれらの修飾された第VII因子組成物を投与することが可能であり、そして治療者により所望されると思われる。

予防的適用においては、修飾された第VII因子を含む組成物が、患者自身の抗凝固能力を増強するために、疾病状態又は損傷を受けやすいか又はその危険性で患者に投与される。そのような量は、“予防的有効用量”であると定義される。この使用においては、正確な量は再び、患者の健康状態及び体重に依存し、そして一般的には、約0.05mg～約500mg／70kgの患者の体重、より通常には約1.0mg～約200mg／70kgの患者の体重の範囲である。

組成物の一回又は複数回の投与が実施され、そして用量レベル及

びパターンは治療者により選択される。毎日の維持レベルを必要とする通院患者のためには、修飾された第VII因子は、たとえばポータブルポンプシステムを用いて、連続的注入により投与され得る。

修飾された第VII因子の局所供給、たとえば血栓形成に対して敏感な血管部位（たとえば吻合の部位）で、又は低められた開通性に対して敏感な血管部位での修飾された第VII因子の局所適用は、たとえば噴霧、灌流、二重バルーンカテーテル、血管移植片又はステント中に組込まれるステント、バルーンカテーテルを被覆するために使用されるヒドロゲル、又は他の十分に確立された方法により実施され得る。いずれにせよ、医薬配合物は、患者を効果的に処理するのに十分な本発明の修飾された第VII因子の量を供給すべきである。

次の例は、例示的であって、本発明を制限するものではない。

実施例

## 例 I

Ser<sub>344</sub><sup>®</sup> Ala<sub>344</sub> 第VII因子の発現

Ser<sub>344</sub><sup>®</sup> Ala第VII因子活性部位変異体を生成するために、プラス

ミドF VII(565+2463)/pDX(引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第4,784,950号; 受託番号40205としてAmerican Type Culture Collectionに寄託される)を、Xba I 及びKpn I により消化し、そしてセリン344のためのコード領域を含んで成る、得られる0.6kbフラグメントを回収した。このフラグメントを、図に示されるようにして、Xba I, Kpn I により消化されたM13mp19中にクローン化した。この操作及び下記に記載されるような続く段階は、一般的に標準的プロトコール(たとえば、Maniatisなど., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982)(引用により本明細書に組込まれる)により記載されるような)に従って実施された。

変異誘発を、変異誘発性オリゴヌクレオチドZC1656 (5' TGG GCC TCC GGC GTC CCC CTT 3') 及び“ユニバーサル”第2プライマーZC87 (5' TCC CAG TCA CGA CGT 3') を用いて、Zoller and Smith、前記の方法に従って、M13鋳型に対して実施した。陽性ブランクを取り、そして鋳型DNAを調製し、そして1077でのPst I 部位から1213でのKpn I までを配列決定した。配列の分析により、所望の突然変異の存在が確かめられた。その変異体クローンを、1656と命名した。

次に、発現ベクターを、1656クローンをを用いて構成した。変異誘発された配列を、約0.14kbのPst I -Kpn I フラグメントとしてM13ベクターから単離した。このフラグメントを、図に示されるように、F VII(565+2463)/pDXからの1.7kbのHindIII-Xba I フラグメント、F VII(565+2463)/pDXからの0.5kbのXba I -Pst I フラグメント、及びF VII(565+2463)/pDXからの4.3kbのKpn I -HindIIIフラグメントに連結した。所望する変異体配列の存在は、Pst I により変異体及び野生型クローンを、及びKpn I 及びXba I によりM13における変異体第VII因子挿入



体を消化し、前記消化されたDNAのサザンブロットを調製し、そして前記ブロットを放射性ラベルされたZC1656をプローブすることによって確認された。

子供のハムスター腎細胞系BHK570（受託番号10314としてAmerican Type Culture Collectionに寄託される）を、1656発現ベクターの2種の単離体（#544及び#545と称す）によりトランスフェクトした。前記細胞を、BHK570細胞の集密的（confluent）10cmプレートを、非選択培地（10%ウシ胎児血清及び1%PSN抗生物質混合物〔GIBCO Life Technologies, Gaithersburg, MD〕を含むダルベッコ変

性イーグル培地〔DMEM〕）を含む5個の10cmプレートに1:10の割合に希釈することによって調製した。24時間後、細胞が20~30%の集密度に達した場合、それらを、1656変異をコードする発現ベクターの1つの単離物、プラスミドp486（アデノウイルス5起点、SV40エンハンサー、アデノウイルス2主要後期プロモーター、アデノウイルス2トリパルタイト（tripartite）リーダー、5'及び3'スプライス部位、DHFRのcDNA及びpML-1(Lusky and Botchan, Nature 293:79-81, (1981))におけるSV40ポリアデニル化シグナルを含んで成る）、及び10mgのキャリアーDNA（音波処理されたサケ精子DNA）により同時トランスフェクトした。前記DNAを15mlの管に添加し、次に、0.5mlの2×Hepes（25gのHepes、40gのNaCl、1.8gのKCl、0.75gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、5gデキストロース、蒸留水により2.5lに希釈され、そしてpH6.95~7.0にpH調整されている）を添加し、そして管を混合した。個々の管におけるDNAを、パストゥールピペットによりDNA/Hepes溶液に空気を泡立てして送りながら、0.25Mの $\text{CaCl}_2$  0.5mlの添加により沈殿せしめた。次に、管を回転せしめ、室温で15分間インキュベートし、そして再び回転せしめた。次に、そのDNA混合物をピペットにより細胞のプレート上に滴下した。プレートを回転せしめ、そして37℃で4~6時間インキュベートした。インキュベーションの後、トリスー塩溶液（0.375gのKCl、0.71gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、8.1gのNaCl、3.0gのトリスーHCl、0.5gのスクロース、合計1lに希釈され、そしてpH7.9にpH調整されている）に希釈された20%グリセロール2mlを個々のプレートに添加した。プレートを回転せしめ、そして室温で2分間放置した。次に、培地をプレートから除去し、そして2mlのトリスー塩溶液により交換した。プレートを室温で

2分間放置し、次にトリスー塩溶液を除去し、そして10mlの非選択培地により交換した。プレート

を37℃で2日間インキュベートした。

表 1

トランスフェクション\*

	544	545	544対照	545対照
プラスミドの名称				
クローン544	15ml	—	15ml	—
クローン545	—	30ml	—	30ml
p486	1.5ml	1.5ml	—	—
キャリアーDNA	1.6ml	1.6ml	1.6ml	1.6ml

\*：使用されるDNA濃度 次の通りであった：クローン544:0.7mg/ml；クローン545:0.3mg/ml；p486:1.49mg/ml。

2日間のインキュベーションの後、細胞を、選択培地（10%ウシ胎児血清、1%PSN抗生物質混合物及び150nMのメトトレキサートを含むDMEM）により希釈し、そして大型プレートに1：100、1：250及び1：500の希釈度でプレートした。プレートを37℃で1週間インキュベートした。1週間後、培地を変え、そして選択培地により交換し、そしてプレートをコロニー形成について調べた。

コロニー形成後8日で、12のコロニーを、#544及び#545トランスフェクションプレートの1：500希釈プレートからランダムに選択した。個々のクローンを、6-ウェルプレートの1つのウェル中にプレートし、そして選択培地において増殖した。7日後、プレートは集密的になり、そしてクローンを選択培地を含む10cmプレートにそれぞれ分けた。

上記クローン、及び野生型第VII因子を発現するようトランスフェクトされた対照細胞を、<sup>35</sup>S-メチオニン-システインタンパク質ラベリング混合物（NEN DuPont Biotechnology Systems, Wilmingt

on, DE) により代謝的にラベルした。クローンを増殖し、選択培地でパルスラベル実験のために準備をした。細胞をリン酸緩衝溶液(Sigma, St.Louis, MO)によりすすぎ、そして20mCi/mlの $^{35}\text{S}$ -Cys- $^{35}\text{S}$ -Metにおいて4時間パルスした。4時間後、上清液及び細胞を収穫した。細胞を、Lenk and Penman(Cell 16:289-302(1979))により実質的に記載されるようにして溶解し、そしてそれぞれの溶解物400mlを50mlのstaphA (Sigma, St.Louis, MO) により予備清浄した。

代謝的にラベルされた細胞からのサンプルを、まず、6 mlの抗-第VII因子ポリクローナル抗血清と共に前記サンプルを4時間インキュベートすることにより、ラジオイムノ沈殿(RIP)せしめた。60 $\mu$ lの洗浄されたスタフィロコカル (Staphylococcal) プロテインAを個々のサンプルに添加し、そしてサンプルを1.5時間4℃で揺り動かした。サンプルを遠心分離し、そして上清液を除去した。ペレットを、0.7MのRIPA緩衝液(10mMのトリス、pH7.4、1%のデオキシコール酸[Calbiochem Corp., La Jolla, CA]、1% Triton X-100、0.1%のSDS、5 mMのEDTA、0.7MのNaCl)により2度、及び0.15MのRIPA緩衝液(10mMのトリス、pH7.4、1%のデオキシコール酸[Calbiochem Corp., La Jolla, CA]、1%のTriton X-100、0.1%のSDS、5 mMのEDTA、0.15MのNaCl)により1度、洗浄した。100 $\mu$ lの1 $\times$ SDS色素(50mMのトリス-HCl、pH6.8、100mMのジチオトレイトール、2%のSDS、0.1%のプロモフェノールブルー、10%のグリセロール)を個々のサンプルに添加し、そしてそのサンプルを5分間、煮沸し、続いて、遠心分離し、プロテインAを除去した。50 $\mu$ lの個々のサンプルを、10%のポリアクリルアミドゲル上で実験した。結果は、10個のクローンのうち9個が修飾された第VII因子を分泌したことを示した。

## 例 II

### 修飾された第VII因子の抗凝固活性

凝固を阻害する修飾された第VII因子タンパク質の能力を、対照として野生型第VII因子を用いて、一段階凝固アッセイにより測定した。組換えタンパク質を、5 mg/mlのビタミンKを含む培地において培養された細胞から、実質的に上記のようにして調製した。種々の量の修飾された第VII因子(クローン544からの)

又は組換え野生型第VII因子を、50mMのトリス、pH7.5、0.1%のBSA溶液において100mlに希釈した。それらの混合物を、100mlの第VII因子-不完全血漿 (George King Bio-Medical Inc., Overland Park, KS) 及び200mlのトロンボプラスチンC (Dade, Miami, FL; ウサギの脳トロンボプラスチン及び11.8mMのCa<sup>2+</sup>を含む) と共にインキュベートした。凝固アッセイを、自動凝固タイマー (MLA Electra 800, Medical Laboratory Automation Inc., Pleasantville, NY) において実施し、そして凝固時間を、通常のプールされたヒト血漿 (1mlの第VII因子活性当たり1単位を含むと思われる; 健康なドナーからのクエン酸塩加の血清をプールすることによって調製される) の1:5~1:640希釈溶液により構成された標準曲線を用いて、第VII因子活性の単位に転換した。このアッセイを用いれば、修飾された第VII因子の調製物は、検出できる凝固活性を示さなかった。表2は、対照(トランスフェクトされていない)BHK細胞-ならし培地 (+/- ビタミンK)、野生型第VII因子、及び修飾された第VII因子を発現する細胞の2種の単離物についての凝固時間に関するアッセイの結果を示す。第VII因子活性は、対照サンプルを超える凝固時間の低下として見られる。

表 2

サンプル	希釈度	凝固時間 (秒)
対照 + K	1 : 5	33.1
	1 : 10	33.4
対照 - K	1 : 5	34.3
	1 : 10	33.2
野生型第VII因子	1 : 20	19.0
	1 : 40	21.5
	1 : 80	23.3
修飾された第VII因子 (#6)	1 : 1	33.5
修飾された第VII因子 (#10)	1 : 1	32.5

血漿因子基質に対する修飾された第VII因子の効果を決定するために、修飾さ

れた第VII因子及び組換え野生型又は天然の第VII因子の調製物を、第X因子又は第IX因子のいずれかと共にインキュベートし、そしてその活性化を、凝固アッセイ又はポリアクリルアミドゲル電気泳動によりモニターした。

### 例 III

#### 組織因子を結合する修飾された第VII因子の能力

組織因子に関して野生型第VII因子と競争し、そしてその凝固活性を阻害する修飾された第VII因子の能力を、制限量の組織因子（トロンボプラスチン）の存在下で一段階凝固アッセイにおいて評価した。

凝固時間を、例IIに記載されるアッセイに類似する一段階アッセイにおいて決定した。限定された量の組織因子、一定量の野生型第VII因子、及び増加する量の変異体第VII因子を、この混合実験に使用した。第VII/VII<sub>a</sub> 因子予備凝固活性の阻害が、増加する量の変異体

第VII因子を含むアッセイにおいて凝固時間の上昇として見られる。

試験サンプルにおける第VII因子活性の量を、通常のプールされた血漿において第VII因子活性を測定された標準曲線の百分率として計算した。第VII因子活性についての標準曲線を、1 : 5 ~ 1 : 640の範囲である、リン酸緩衝溶液(PBS)における通常のプールされた血漿の一連の希釈度を用いて生成した。このためには、通常の血漿は約500ng/mgの第VII因子を含むことが想定され、そしてこれが1単位の活性として見なされた。100mlの第VII因子-不完全血漿、100mlの血漿希釈溶液及び200mlのトロンボプラスチン-C (Dade, Miami, FL) の混合物を用いて、MLA Electra 800自動タイマー上で凝固時間を測定した。標準曲線を確立するために、結果を、活性の百分率（1 : 5 = 100%活性）対凝固時間（秒）としてグラフで示した。

アッセイは、野生型及び変異体第VII因子を含む培地が1%以下の血清から構成されることを必要とした。希釈は、凝固時間が標準曲線にそって生じるようにPBSにおいて行なわれた。1 : 2の最小希釈が典型的であった。その最終体積は100mlであった。クローン“# 10”及び“# 6”と称する、2種の異なったヒト第VII因子Ser<sub>344</sub>

® Ala変異体をこの実験において試験した。下記表に示される結果は、第VII因子変異体の量が上昇するにつれて、第VII<sub>a</sub>因子活性の百分率が低下したことを示す。

表 3

Ser<sub>344</sub>→Alaとの混合アッセイの結果

変異体 (B4A1 (野生型) 培地が10 $\mu$ l / 反応で100%活性として使用された)

Ser <sub>344</sub> →Ala クローン番号	変異体 培地の量	B4A1培 地の量	BHK対照*	F VII <sub>a</sub> の % 活性
# 10	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	70
# 10	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	51
# 10	30 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	43
# 10	40 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	34
# 10	50 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	28
# 10 ( - K ) <sup>§</sup>	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	78
# 6	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	74
# 6	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	56
# 6	30 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	46
# 6	40 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	41
# 6	50 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	32
# 6	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	85
BHK対照	0	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	91
BHK対照 ( - K )	0	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	107

\* : トランスフェクトされていないならし培地

§ : 第VII因子変異体の発現のために、“ ( - K ) ” として示されたもの以外は、細胞はビタミンKの存在下で増殖された。

それらの実験は、Ser<sub>344</sub>® Ala置換を有する第VII因子の変異体が用量依存的態様で生来の第VII因子と競争し、そして生来の第VII/VII<sub>a</sub> 因子の予備凝固活性 (procoagulant) を阻害したことを示した。

従って、Ser<sub>344</sub>® Ala変異体ヒト第VII因子が生来のヒト第VIIa因子と競争し、そして結果的に、ヒト血漿において第X及び／又はIX因子の活性化を阻害することが結論づけられ得る。

#### 例 IV

##### PPACKと第VII因子との反応

組換え第VII因子を、トランスフェクトされた子供ハムスター腎細胞において生成した。Thimなど.(Biochemistry 27: 7785-7793, 1988)、Brinkousなど.(Proc.Natl.Acad.Sci:USA 86: 1382-1386, 1989)及びBjoem and Thim(Res.Disc1. No.269, 564, 1986)(それらは引用により本明細書に組込まれる)により開示されるようにして、タンパク質を精製し、そして活性化した。細胞培養物培地を回収し、濾過し、そして塩濃度を低めるために希釈した。次に、希釈された培地を、CaCl<sub>2</sub>を含む溶出緩衝液を用いて、アニオン交換クロマトグラフィーにより分別した。第VII因子画分を回収し、そしてさらに、カルシウム依存性抗-第VII因子モノクローナル抗体を用いて、イムノクロマトグラフィーにより精製した。追加の精製を、2種のアニオン交換クロマトグラフィー段階を用いて実施し、ここで第VII因子はそれぞれCaCl<sub>2</sub>及びNaClを用いて溶出された。第VIIa因子を、最終溶出液において回収した。

50mMのトリス-HCl、100mMのNaCl、5 mMのCaCl<sub>2</sub>、pH7.4の溶液中、組換え第VIIa因子(1 mM)を、20mMのPPack(D-フェニルアラニル-プロイール-アルギニル-クロロメチルケトン; Calbiochem, La Jolla, CA)と共に5, 20及び60分間インキュベートした。色原体基質S2288(H-D-イソロイシン-ル-プロイール-ル-アルギニン-p-ニトロアニリド; Kabi Vitrum AB, Molndal Sweden)を含む緩衝液を添加し、2.5倍の希釈度及び0.3mMの最終濃度のS2288を得た。p-ニトロアニリンの生成を、測定し、そして対照として、処理されていない第VIIa因子を用いての結果と比較した。その結果

は、第VIIa因子が、それらの反応条件下で約60分後、十分に不活性化されることを示した。

#### 例 V

### DEGR—第VII<sub>a</sub> 因子の生成

組換えヒト第VII<sub>a</sub> 因子を、例IVに記載のようにして調製した。10mMのグリシン緩衝液、pH8.0、10mMのCaCl<sub>2</sub>、50mMのNaClの溶液中、組換えヒト第VII<sub>a</sub> 因子を、1.5mg/mlの濃度に希釈した。蒸留水により溶解された、10倍モル過剰のダンシル-Glu-Gly-Arg-クロロメチルケトン、DEGRck (Calbiochem, La Jolla, CA 92037) を、第VII<sub>a</sub> 因子に添加した。37℃での2時間のインキュベーションの後、第2の10倍モル過剰のDEGRckを前記混合物に添加し、そして37℃でさらに2時間インキュベートした。第3の10倍モル過剰のDEGRckを第VII<sub>a</sub> 因子に添加し、そして4℃で約16時間インキュベートした。DEGR—第VII<sub>a</sub> 因子サンプルを、トリス緩衝溶液 (0.05Mのトリス-HCl、0.1MのNaCl、pH7.5) に対して4℃で広範に透析し、遊離DEGRckを除去した。

最終DEGR—第VII<sub>a</sub> 因子混合物を、第X<sub>a</sub> 因子色原体基質アッセイにおいて遊離DEGRckの存在について試験した。DEGR—第VII<sub>a</sub> 因子混合物を、色原体基質S-222と共に、精製されたヒト第X<sub>a</sub> 因子に添加した。この基質は第X<sub>a</sub> 因子により特異的に切断されるが、しかし第VII<sub>a</sub> 因子によっては切断されない。混合物における結合されていないDEGRckは第X<sub>a</sub> 因子に結合することができ、そしてそれにより、第X<sub>a</sub> 因子の色原体活性を阻害することができる。第X<sub>a</sub> 因子混合物中への遊離DEGRckのス파이キングは、第X<sub>a</sub> 因子色原体活性の阻害に対する溶液における遊離DEGRckのレベルを測定するための標準曲線を生成した。DEGR—第VII<sub>a</sub> 因子混合物の分析は、遊離DEGRck : DEGR—第VII<sub>a</sub> 因子の割合が、広範な透析に続いて0.5%以下で

あることを示し、それにより、下記に記載される種々のアッセイシステムにおいてDEGR—第VII<sub>a</sub> 因子により観察される阻害が遊離DEGRckの存在によるものではないことを確実にした。

### 例 VI

#### ラット平滑筋細胞上での第X<sub>a</sub> 因子生成

血管平滑筋細胞を、細胞—表面組織因子の存在について分析した。この分析は、第X<sub>a</sub> 因子に対して特異的である色原体基質を用いて、第X<sub>a</sub> 因子への第X<sub>a</sub> 因



子の転換を刺激する細胞の能力を測定することによって行った。

ラット血管平滑筋細胞 (Clowesなど., J.Clin.Invest. 93:644-651(1994)) を、96ウェル培養皿 (American Scientific Products, Chicago, IL) 中に、増殖培地 (表4) を有するウェル当たり8,000個の細胞でプレートした。

表 4

---

500mlのダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM)(GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD.);

10% ウシ胎児血清 (Hyclone, Logan, UT.);

1 mMのピルビン酸ナトリウム (Irvine, Santa Ana, CA.);

0.29mg/mlのL-グルタミン (Hazelton, Lenexa, KS.);

1 × PSN (100×は5 mg/mlのペニシリン、5 mg/mlのストレプトマイシン、10mg/mlのネオマイシンである)(GIBCO-BRL; Gaithersburg, MD.)

---

37℃で48時間のインキュベーションの後、培地を、血清を含まない培地 (表5) に変えた。

表 5

---

250mlのダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM);  
 250mlのHam's F-12培地 (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA);  
 1 mMのピルビン酸ナトリウム;  
 0.29mg/mlのL-グルタミン;  
 20mMのトランスフェリン (JRH, Lenexa, KS.);  
 5 mMのインシュリン (GIBCO-BRL);  
 16ngのセレン (Aldrich, Milwaukee, WI.);  
 1 mg/mlのウシ血清アルブミン (Sigma, St. Louis, MO.)

---

細胞を37℃で72時間インキュベートした。インキュベーションの後、PDGF-BB(10ng/ml)又は10%ウシ胎児血清のいずれかを細胞に添加し、組織因子発現を刺激した(Taubmanなど, *J.Clin.Invest.* 91: 547-552, 1993)。類似する組の細胞は、刺激されていない細胞の固有の活性についてモニターするためにPDGFも血清も受動しなかった。6時間のインキュベーションの後、組換えヒト第VIIa因子を、10nMの最終濃度で細胞に添加した。一組の細胞は、負の対照として添加される第VIIa因子を有さなかった。細胞を37℃で2時間インキュベートし、そしてHEPES緩衝液 (10mMのHEPES) 137mMのNaCl、4 mMのKCl、5 mMのCaCl<sub>2</sub>、11mMのグルコース、0.1%のBSA) により洗浄した。洗浄の後、細胞を、5 mMのCaCl<sub>2</sub>により補充されたトリス-緩衝溶液中、200nMの血漿-精製されたヒト第X因子の溶液50ml (ウェル当たり) と共に5分間インキュベートした。25 $\mu$ lの0.5MのEDTA及びS-2222色原体基質 (Kabi Pharmacia, Franklin, OH) の800mM溶液25mlを個々のウェルに添加した。プレートを

室温で40分間インキュベートし、次に、THERMOMAXマイクロプレート読取り機 (Molecular Devices, Menlo Park, CA)を用いて405nmで分析した。

表6は、対照のウェル (第VIIa因子が添加されていない) に比較して、第VIIa因子により処理されたウェルについての吸光度の上昇を示す。吸光度の上昇は

、ウェルにおいて生成される第X a 因子のレベル、及び発色団を開放する、色原体基質のその続く分解の直接的な測定である。そのデータはまた、PDGF-BB又は10%ウシ胎児血清のいずれかにより前処理された細胞における色原体活性のレベルが刺激されていない細胞よりも高かったことを示す。

表 6

試験サンプル	OD <sub>405</sub>
対 照	0.043
固有の	0.247
PDGF-BB	0.360
10% FCS	0.342

それらの結果は、ラット血管平滑筋細胞の細胞表面上に第X因子から第X a 因子への第VII a 因子-依存性活性化が存在することを明確に示す。

#### 例 VII

##### DEGR-第VII a 因子による細胞表面色原体活性の阻害

ラット血管平滑筋細胞を、上記のようにして96-ウェル培養皿にプレートした。細胞を上記のようにして血清を有さない培地において72時間培養し、そして10%ウシ胎児血清の添加により6時間処理し、組織因子発現を刺激した。刺激の後、緩衝液のみ(対照)、10nMの第VII a 因子、又は10nMの第VII a 因子+100nMのDEGR-第VII a 因

子を個々のウェルに添加した。細胞を37℃で2時間インキュベートし、次に、HEPES緩衝液により洗浄した。洗浄の後、細胞を、5 mMのCaCl<sub>2</sub>により補充されたトリス-緩衝溶液中、200nMの第X因子の溶液50μl(ウェル当たり)と共に5分間インキュベートした。0.5MのEDTA 25μl及びS-2222(800nM)の色原体基質(Kabi Pharmacia) 25μlを個々のウェルに添加した。細胞を室温で40分間インキュベートした。色原体活性を、上記のようにして405nmで分析した。

表7は、第VII a 因子のみにより処理されたウェルにおける色原体活性の刺激、及びDEGR-第VII a 因子が第VII a 因子と共に同時インキュベートされる場合の

刺激の阻害性を示す。それらの結果は、DEGR-第VII<sub>a</sub>因子が第VII<sub>a</sub>因子結合のための競争アンタゴニストとして作用し、それにより、第X<sub>a</sub>因子への第X因子の活性化及びS-2222色原体の続く切断を阻害することを示す。

表 7

試験サンプル	OD <sub>405</sub>
対 照	0.035
第VII <sub>a</sub> 因子	0.342
第VII <sub>a</sub> 因子 + DEGR-第VII <sub>a</sub> 因子	0.073

## 例 VIII

ラット平滑筋細胞上での細胞表面色原体活性のDEGR-第VII<sub>a</sub>因子による用量依存性阻害

ラット血管平滑筋細胞を、1%ウシ胎児血清（表4におけるように、10%ウシ胎児血清ではない）により補充された増殖培地において、ウェル当たり4,000個の細胞で、96-ウェル培養皿にプレート

した。5日後、培地を除去し、そして上昇する濃度の第VII<sub>a</sub>因子のみ又は10nMの第VII<sub>a</sub>因子及び上昇する濃度のDEGR-第VII<sub>a</sub>因子のいずれかを細胞に添加した。細胞を第VII因子混合物と共に37℃で2時間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を洗浄し、そしてトリス緩衝溶液中、200nMの第X因子の溶液50mlと共に室温で5分間インキュベートした。個々のウェルは、0.5MのEDTA 25ml及びそれに添加される800mMのS-2222 (Kabi Pharmacia) 25mlを有し、そしてプレートを室温で40分間インキュベートした。色原体活性を、上記のようにしてマイクロプレートリーダーにより405nmで分析した。

表8は、ウェルに添加される上昇する量の第VII<sub>a</sub>因子と共に、色原体活性の用量-依存性上昇を示す。DEGR-第VII<sub>a</sub>因子と100nMの第VII<sub>a</sub>因子との混合物が細胞に添加される場合（表9）、色原体活性の用量依存性阻害が存在した。1:1のモル比でのDEGR-第VII因子:第VII<sub>a</sub>因子が、約95%の色原体活性を阻害

した。それらのデータは、この実験企画において、DEGR-第VIIa因子が、培養での平滑筋細胞上で生来の第VIIa因子よりも細胞表面組織に対して有意に高い親和性を有することを示唆する。DEGR-第VIIa因子及び第VIIa因子が結合組織因子に対して等しい親和性を有する場合、それらの2種の分子が等モル比で細胞に添加される場合に観察される阻害のレベルはそれほど高くはなかった。

表 8

第VIIa因子の濃度 (nM)	OD <sub>405</sub>
0.10	0.005
0.39	0.025
1.56	0.058
6.25	0.111
25.00	0.154
100.00	0.208

表9は、DEGR-第VIIa因子によるラット平滑筋細胞上での第Xa色原体活性の用量依存性阻害を示す。上昇する濃度のDEGR-第VIIa因子を100nMの第VIIa因子と共に同時インキュベートし、そして第Xa因子色原体活性を、色原体S-22を用いて決定した。

表 9

DEGR-第VIIa因子の濃度 (nM)	OD <sub>405</sub>
0.10	0.208
0.39	0.176
1.56	0.116
6.25	0.073
25.00	0.026
100.00	0.014

# 可溶性組織因子アッセイにおける DEGR-第VII<sub>a</sub> 因子による第X<sub>a</sub> 因子生成の阻害

精製された組換え可溶性組織因子を用いての第X<sub>a</sub> 因子への第X 因子の転換を、色原体アッセイを用いて確立した。組織因子を発現

し、そしてサッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から精製した(Shigematsuなど., *J.Biol.Chem.* 267:21329-21337, 1992)。可溶性組織因子が精製され、そしてDr. W.Kisiel (University of New Mexico) により特徴づけられた。65.9mlの可溶性組織因子(2.2mM)、29.0mlのPCPS(1 mM, Sigma, St. Louis, MO)、29.5mlのヒト第X 因子(4.1mM)、2.77mlのハンクス緩衝液(25mMのトリス、pH7.4、150mMのNaCl、2.7mMのKCl、5 mMのCaCl<sub>2</sub>、0.1%のBSA)を含む反応混合物を調製した。40 $\mu$ l の組織因子/第X 因子混合物、TBSにより希釈された第VII<sub>a</sub> 因子25ml及びTBSにより希釈されたDEGR-第VII<sub>a</sub> 因子25mlを、96-ウェルマイクロタイタープレートの個々のウェルに添加した。40mlの組織因子/第X 因子混合物；TBSにより希釈された第VII<sub>a</sub> 因子25ml及びTBS 25mlを用いる対照が包含された。10 $\mu$ l のS-2222 (4 mM) の色原体基質をウェル中の反応混合物に添加し、そして室温で2～10分間インキュベートした。結果を、上記のようにしてマイクロプレートリーダーにより405nmで分析した。

第X 因子の第VII<sub>a</sub> 因子活性化についての標準曲線の決定を、DEGR-第VII<sub>a</sub> 因子の不在下で、添加される、上昇する濃度の第VII<sub>a</sub> 因子を用いて行なった。表10に示される結果は、反応混合物に添加される第VII<sub>a</sub> 因子の上昇する量と共に、色原体活性の用量依存性上昇が存在することを示す。種々の量のDEGR-第VII<sub>a</sub> 因子及び100nMの第VII<sub>a</sub> 因子の同時添加は、色原体活性の用量依存性低下を導びいた(表11)。それらのデータは、DEGR-第VII<sub>a</sub> 因子が可溶性組織因子に結合する生来の第VII<sub>a</sub> 因子に対して競争アンタゴニストとして作用し、そしてそれにより、色原体基質S-2222に対する色原体活性の低下により測定されるように第X<sub>a</sub> 因子の生成を阻害することを示す。

可溶性組織因子に添加される、上昇する濃度の第VII<sub>a</sub>因子による第X<sub>a</sub>因子色原体活性の刺激。光学密度の変化を、色原体基質S-2222を用いて測定した。

第VII <sub>a</sub> 因子の濃度 (nM)	OD <sub>405</sub>
0.78	0.168
1.56	0.288
3.12	0.478
6.25	0.694
12.50	0.764
25.00	0.790
50.00	0.738
100.00	0.770

表 11

生来の第VII<sub>a</sub>因子の存在下で、可溶性組織因子へのDEGR-第VII<sub>a</sub>因子の添加による第X<sub>a</sub>因子色原体活性の阻害を測定する。光学密度の変化を、色原体基質S-2222を用いて測定した。

DEGR-第VII <sub>a</sub> 因子の濃度 (nM)	OD <sub>405</sub>
0	0.810
50	0.750
100	0.609
200	0.296
400	0.167
800	0.083
1600	0.055

#### 例 X

##### DEGR-第VII<sub>a</sub>因子による凝固の阻害

凝固時間に対するDEGR-第VII<sub>a</sub>因子の効果をモニターするための標準凝固ア

ッセイを次のようにして調製した：凝固剤としてクエン酸ナトリウムにより集められた通常のヒヒ血漿100mlを、TBS(20mMのトリス、pH7.4、150mMのNaCl)に希釈された100mlの種々の濃度のDEGR-第VIIa因子に添加した。サンプルを混合し、そして37℃で短時間インキュベートした。そのサンプルを、Electra 800自動凝固タイマー (Medical Laboratories Automation, Pleasantville, NY) に添加した。インキュベーションの後、25mMのCaCl<sub>2</sub>を含む組織因子調製物200mlを、DEGR-第VIIa因子調製物に添加した。組織因子調製物を、新しく凍結された脳組織からのヒヒ脳の塩溶液抽出物として製造し、そしてヒヒ血漿において凝固を開始するその能力について特徴づけた。約40秒の凝固時間を付与する濃度の組織因子を選択した。

表12に示されるデータは、DEGR-第VIIa因子の添加による凝固時間の用量依存性上昇を示す。血漿における1mg/mlほどの低いDEGR-第VIIa因子の用量が、凝固時間の有意な上昇をもたらした。

表 12

DEGR-第VIIa因子による凝固時間の用量依存的上昇

DEGR-第VIIa因子 ( $\mu$ g/mlの血漿)	凝固時間 (秒)
0	40.7
0.5	46.2
1.0	50.8
2.5	64.5
5.0	108.1
10.0	158.4

## 第 X I

### DEGR-第VIIa因子による血小板蓄積の阻害

DEGR-第VIIa因子を、非ヒト霊長類における機械的損傷による動脈血栓の部位で血小板蓄積を阻害するその能力について分析した。大動脈血管内膜切除のモ



デルを、Lumsdenなど、(Blood 81:1762-1770(1993))により実質的に記載されるようにして、ヒヒにおいて使用した。長さ1～2 cmのヒヒの大動脈の断片を除去し、逆にし、そして削り、動脈の内膜及び中膜の約50%を除去した。動脈をその正しい方向に戻し、両端上にカニール挿入し、そしてヒヒにおける体外シャント中に配置し、それにより、機械的に傷つけられた動脈をそのシャントを通してヒヒの血液に暴露した。循環血液へのシャントの開通の直前、ラベルされた自己由来の血小板を、前記動物中の静脈に注入した。傷つけられた動脈の部位での血小板蓄積のレベルを、同時γカメラ像により決定した。

血小板蓄積の阻害についてのDEGR-第VII<sub>a</sub>因子の評価を、DEGR-第VII<sub>a</sub>因子又は塩溶液対照のボラス注入を用いて行ない、そして

シャントの開通の直前に付与した。傷つけられた動脈を、60分間、連続して測定した。0.005mg/kgの用量のDEGR-第VII<sub>a</sub>因子が血小板蓄積を阻害した。1.0mg/kgのボラス注入で、血小板蓄積の約90%が、薬物投与の1時間後で阻害された。それらの結果は図2に示される。

それらのデータは、DEGR-第VII<sub>a</sub>因子による組織因子の阻害が急性血管損傷の非ヒト霊長類モデルにおいて血小板に富んでいる血栓の進行を有意に阻害することができることを示す。

#### 例 XII

DEGR-第VII<sub>a</sub>因子は、アテローム切除のウサギにおいてバルーン血管形成に続いての血管再狭窄を阻害する

DEGR-第VII<sub>a</sub>因子を、New Zealand White (NZW) アテローム切除のウサギにおいてバルーン血管形成に続いての外傷の進行を調節するその能力について評価した。この動物モデルは、十分に特徴づけられており、そして血管外傷進行に対する抗-血栓化合物を評価するための良好なモデルであることがわかっている(Gimpleなど、Circulation 86:1536-1546 (1992)、及びRogostaなど、Circulation 89:1262-1271(1994))。DEGR-第VII<sub>a</sub>因子を評価するために使用されるこの動物モデルは、Rogosta、前記により実質的に記載されている通りである。

5 mg/kgのキシラジン及び35mg/kgのケタミンを筋肉内注射することによって

ウサギに麻酔をかけた。近位大腿動脈を、近位及び遠位結紮による単経靱帯下の切開により暴露した。単離された断片を、27ゲージの針によりカニューレ挿入した。開口を、針で突き刺すことによって作った。単離されたセグメントを塩溶液によりフラッシュし、残留血液を清浄し、そして80ml/分の速度で8分間、注入される空気により乾燥せしめた。空気乾燥に続いて、単離されたセグ

メントを再び、塩溶液によりフラッシュし、そして結紮糸を除いた。止血を、非閉塞性局部圧力により維持した。断片を金属クリップにより区別した。局部痙攣を1%キシロカインにより局部的に処理した。手術の次の日、バルーン血管形成まで1カ月間、動物に1%コレステロール及び6%ピーナツ油の食事を与えた。10mg/kgのタイレノールを、手術後の苦痛の緩和のために3～5日間与えた。アンビペン(Ambipen)1ccを、手術後の第3～5日の間与えた。

動物のための試験薬物供給は、バルーン血管形成の直前での初期ボラス注入、続いて、内部頸静脈を通しての浸透ポンプによる連続的な全身性注入から成った。薬物注入の期間は3日であった。対照動物は、バルーン血管形成の前、150U/kg IVボラスでのヘパリン、続く塩溶液注入を受けた。DEGR-第VIIa因子により処理された動物は、1mg/kgのボラス注入、続く50mg/kg/時での注入を受けた。

連続した全身的注入のための浸透ポンプの配置のために、上記のようにして動物に麻酔をかけ、そしてケタミン及びキシラジンの追加の1M注入によりその工程を通して麻酔を維持した。首の中央の切開を通して、右の内部頸静脈を、おおまかな切開口により単離し、そして遠位端を連結した。シラスチック管(PE-160)を、右の内部頸静脈中に導入した。皮下トンネルを創造し、そのシラスチック管を通した。この管を浸透ポンプにより連結した。その浸透ポンプを、ウサギの背部に皮下移植した。右の通常の頸動脈をおおまかな切開により単離し、そしてその遠位端を連結した。動脈切除を通して、5F導入機を配置し、そして大動脈弓の連結部に進めた。血液を、止血パラメーター、薬物及びコレステロールレベルの決定のために抜き取った。20mgのキシロカインを動脈内注射した。対照の大動脈腸骨大腿骨血管造影を、手動で3秒間にわたって注入される3

～4 mlのレノグラフィンを用いて、大動脈分岐の上部に位置する5 F Bermanカテーテルを通して実施した。

Bermanカテーテルの除去の後、0.014インチの誘導針金を、下行大動脈に導入し、そして大動脈分岐上に位置決定した。透視誘導下で、2.0～2.5mmの適切にサイズ分けされたバルーン血管形成カテーテルを導入し、そして誘導針金にわたって進め、そして狭窄を横切って位置決定した。バルーンを手動空気注入器により6大気、60秒間、膨張せしめた。3回の膨張を、60秒間隔で実施した。3回の空気注入を60秒の間隔をあけて行った。この工程を、個々の動物の両大腿動脈において実施した。

バルーン拡張に続いて、血管形成カテーテルを引き抜き、そしてBermanカテーテルを大動脈分岐の上3 cmの位置に再導入した。痙攣を最少にするために、20mgのリドカインを動脈内に注入した。後一血管造影方法を上記のようにして行なった。1 cmのグリッドを、実際の直径を計算するために大腿動脈のレベルで位置決定した。次に、カテーテルを除去した。右頸動脈を3-0絹により連結し、そして傷口を層により縫合した。アンビペン及びアセトアミノフェンを上記のように注入した。

血液中のプロトロンビン時間及びDEGR-第VII a 因子の濃度を、試験化合物の予備ボーラス注入の直後、1時間後のボーラス注入及び連続した注入の最後での3日目で決定した。1～2 mlのクエン酸塩加された血漿を得、そしてプロトロンビン時間及び抗原レベルを決定した。

標準的凝固アッセイを、次の通りに、対照及びDEGR-第VII a 因子により処理された動物におけるプロトロンビン時間をモニターするために使用した。抗凝固剤としてのクエン酸ナトリウムにより集められた25  $\mu$  lの試験ウサギ血漿を、150 mlのTBS(20mMのトリス、pH

7.4、150mMのNaCl)に添加した。サンプルを混合し、そしてElectra 800自動凝固タイマー (Medical Laboratories Automation, Pleasantville, NY) に添加した。インキュベーションの後、25mMのCaCl<sub>2</sub>を含む200mlのトロンボプラスチン調製物 (Sigma Chemical) を、血漿調製物に添加した。対照のウサギ血漿において約

20秒の凝固時間を付与する濃度のトロンボプラスチンを選択した。

ELISAアッセイを用いて、対照及びDEGR-第VII<sub>a</sub>因子により処理されたウサギからの血漿サンプルにおけるDEGR-第VII<sub>a</sub>因子の濃度を決定した。アッセイはまず、抗-ヒト第VII因子モノクローナル抗体 (Dr. W.Kisiel, U. of New Mexico) を0.1Mの炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) において2.0mg/mlに希釈し、そして100ml/ウェルを96-ウェルプレートに添加することを包含した。次に、プレートを4℃で一晩インキュベートし、そして続いて、洗浄用緩衝液 (PBS、pH7.4、0.05%のTween 20を含む)を用いて2度洗浄した。非特異的結合部位のブロックを、ブロッキング緩衝液 (PBS、pH7.4、0.05%のTween 20及び1%のBSAを含む)200ml/ウェルにより達成し、37℃で2時間インキュベートし、続いて洗浄用緩衝液を用いて洗浄した。

ブロッキングの後、20~0.027ng/mlの範囲であるDEGR-F VII<sub>a</sub>の一連の標準希釈溶液を、100ml/ウェルで適用される、試験用ウサギ血漿の一連の希釈溶液 (ブロッキング緩衝液において1:100~1:4000) と共に添加した。非免疫ウサギ血漿を負の対照として使用した。次に、プレートを37℃で1時間インキュベートし、続いて、洗浄用緩衝液により4度洗浄した。

DEGR-F VII<sub>a</sub>を、ブロッキング緩衝液中、ウサギ抗-ヒトF VIIポリクローナル抗体 (Dr. Kisiel, U. of New Mexico) の1:1,000希釈溶液100ml/ウェルを添加することによって検出した。プレー

トを37℃で1時間インキュベートし、続いて洗浄用緩衝液により5度洗浄した。特異的抗体結合を、ヤギ抗-ウサギIgG抗体-ペルオキシダーゼ接合体 (Tago, Inc.)の1:2,000希釈溶液100ml/ウェルを用いて検出した。プレートを37℃で1時間インキュベートし、そして洗浄用緩衝液により6度洗浄した。最終的に、100mlの基質溶液 (0.3%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む、0.2Mのクエン酸塩緩衝液 (pH5.0) 中、0.42mg/mlのo-フェニレンジアミンジヒドロクロリド [OPD]) を添加した。室温で1~3分後、色彩反応を、100ml/ウェルの1NのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加することによって停止し、そしてプレートをMicroplate分光光度計上で490nmで読み取った。血漿サンプル中のDEGR-F VII<sub>a</sub>の濃度を、DEGR-F VII<sub>a</sub>標準曲線のA<sub>490</sub>値に未知

のものの $A_{490}$ 値を比較することによって決定した。

プロトロンビン時間及びDEGR-F VII<sub>a</sub>抗原レベルについての血漿サンプルの分析が、それぞれ表13及び表14に示されている。そのデータは、それぞれ個々の動物のために表わされている。表15は平均凝固時間の要約を示している。すべての場合、DEGR-F VII<sub>a</sub>処理された動物は、1時間後のボラス注入時点で高められたプロトロンビン時間を有し、これは3日目の時点でほぼ前処理レベルに戻った。DEGR-F VII<sub>a</sub>抗原レベルの分析はまた、1時間後の時点で血漿における高レベルのDEGR-F VII<sub>a</sub>を示し、これは血漿において2～6 mg/mlの範囲であり、そして3日目の時点で、より低い循環レベルを有した。1時間で測定されるDEGR-F VII<sub>a</sub>のレベルは、通常のウサギ血漿をDEGR-F VII<sub>a</sub>によりインビトロでスパイギングし、そして標準の希釈トロンボプラスチンアッセイでプロトロンビン時間を測定することによって決定される場合、プロトロンビン時間の予測される上昇に一致する。

表 13

プロトンビン時間の測定				
		凝固時間（秒）		
動物の番号	処 置	処置前	1 時間	3 日
73	対 照	24.8	22.3	17.8
74	対 照	24.8	27.9	18.6
75	対 照	24.6	N / D	20.5
76	対 照	22	N / D	17.9
169	対 照	21.2	22.9	22
170	対 照	24.9	23.5	18.6
173	対 照	25.9	21	20.8
174	対 照	25	29.4	20.1
77	DEGR - F VII a	22.5	40.1	18.3
78	DEGR - F VII a	24.3	34	20.9
80	DEGR - F VII a	24.7	50	21.7
96	DEGR - F VII a	N / A	N / A	21
97	DEGR - F VII a	23.6	33.3	21.2
171	DEGR - F VII a	20.6	45.8	21.9
172	DEGR - F VII a	23.5	41.6	22.4

N / A = データは入手できなかった

表 14

ウサギ血漿中のDEGR-F VII aを検出するためのELISA				
		FVIIa ELISA(ng/ml)		
動物の番号	処 置	処置前	1 時間	3 日
73	対 照	0	13	0
74	対 照	36	14	4
75	対 照	0	N / A	9
76	対 照	0	N / A	14
169	対 照	0	0	1
170	対 照	0	0	0
173	対 照	36	31	0
174	対 照	87	86	160
77	DEGR-F VII a	0	3,210	102
78	DEGR-F VII a	1	4,950	7
80	DEGR-F VII a	13	4,543	661
96	DEGR-F VII a	65	4,900	117
97	DEGR-F VII a	4	4,600	502
171	DEGR-F VII a	13	2,145	212
172	DEGR-F VII a	9	2,830	228

N / A = データは入手できなかった

表15. 血漿凝固時間の統計学的要約

## 不対のt-Test X

出血前

DF :		不対の t 値 :		確立 (両者) :
12		1.12		0.2852
グループ :	計数 :	平均 :	標準偏差 :	標準誤差 :
対 照	8	24.15	1.64	0.58
DEGR-VII a	6	23.2	1.48	0.60

## 不対のt-Test X

血管形成後1時間

DF :		不対の t 値 :		確立 (両者) :
10		-5.44		0.0003
グループ :	計数 :	平均 :	標準偏差 :	標準誤差 :
対 照	6	24.5	3.35	1.37
DEGR-VII a	6	40.8	6.53	2.67

## 不対のt-Test X

血管形成後3日

DF :		不対の t 値 :		確立 (両者) :
13		-2.04		0.0622
グループ :	計数 :	平均 :	標準偏差 :	標準誤差 :
対 照	8	19.54	1.53	0.54
DEGR-VII a	7	21.06	1.33	0.50

3週間の血管形成の後、追跡血管造影を、殺す直前まで左頸動脈を通して、上記のようにしてくり返した。垂直な下腹部の切開を通して、遠位大動脈を単離し、隣接部を縛って止血し、そして灌流用カニュレを大動脈分岐上に挿入した。遠位大動脈を50mlの塩溶液によりフラッシュし、続いて、120mmHgで15分間にわたって注入される500mlのHistochoice(AMRESCO, Solon, OH)溶液によりインビ

ボ固定した。灌流が開始されるとすぐに、動物をネムブタール(nembutal)(3mlのナトリウムペンタバルビタールIV、65mg/ml)の過剰量により殺害した。大腿



動脈の5 cmの断片を、両側切除した。その組織を、光顕微鏡のためのHistochoice溶液に保存した。

バルーン血管形成の部位での内膜損傷の進行を決定するために、切断された大腿動脈を連続して3 mm切片に切断し、パラフィンに包埋し、そして切片を個々の動脈の複数の領域から切断した。それらの切片をガラススライド上に積層し、そしてスライドをヘマトキシリン及びエオシン、並びにVan Giemson着色剤により着色した。形態分析をBioquantプログラムに従って実施し、管腔、内膜及び中膜に関する領域測定値を得た。損傷された動脈からの組織切片の形態分析を行ない、全体の管腔面積を測定し；内膜の面積を、内部弾性板内の面積を測定し、そして個々の組織切片からのその対応する管腔面積を引き算することによって決定し；そして中膜の面積を、外部弾性板の内部の面積を測定し、そして内部弾性板の内部の面積を引き算することによって決定した。対照及びDEGR-F VII<sub>a</sub>処理された動物における大腿動脈の内膜損傷についての測定は、DEGR-VII<sub>a</sub>処理された動物における内膜の大きさの有意な低下が存在することを示した（表16）。対照的に、中膜面積の測定は、2種のグループ間で有意な差異が存在しないことを示した。

表 16

バルーン血管形成処理されたウサギにおける 内膜及び中膜の測定				
グループ	N	内膜 (mm <sup>2</sup> )	標準偏差	確立 (両側)
対 照	13	0.819	0.414	0.0138
DEGR-F VII <sub>a</sub>	10	0.438	0.192	
グループ	N	内膜 (mm <sup>2</sup> )	標準偏差	確立 (両側)
対 照	13	0.389	0.098	0.172
DEGR-F VII <sub>a</sub>	10	0.329	0.105	

血管造影的測定からのデータが、対照及びDEGR-F VII<sub>a</sub>処理された動物につ

いての平均管腔直径 (MLD) ± 標準偏差；血管形成直前、血管形成直後及び血管形成後21日として表17に示される。血管形成直前又は直後の測定で、対照とDEGR-F VII a 処理された動物との間にMLDの有意な差異は存在しなかった。しかしながら、血管形成後21日の測定でのDEGR-F VII a 処理された動物においては、MLDの有意な上昇が観察された。

表 17

最小管腔直径 (MLD) の測定				
MLDの予備PTCA測定				
グループ	N	平均MLD	標準偏差	確立 (両側)
対 照	13	1.202	0.24	0.3883
DEGR-F VII a	10	1.283	0.19	
MLDの後 - PTCA測定				
グループ	N	平均MLD	標準偏差	確立 (両側)
対 照	13	1.492	0.551	0.5326
DEGR-F VII a	10	1.323	0.725	
MLDの21日後の測定				
グループ	N	平均MLD	標準偏差	確立 (両側)
対 照	13	0.889	0.228	0.0001
DEGR-F VII a	10	1.393	0.242	

### 例 X III

#### DEGR-F VII a によるヒト SMC 上での細胞表面第 X a 因子生成の阻害

細胞表面色原体アッセイを、上記例VIIIに実質的に記載されているようにして進行せしめ、細胞表面組織因子に結合する F VII a 因子を阻止する DEGR-F VII a の効能及びヒト平滑筋細胞 (SMC) の単層上での第 X 因子の第 X a 因子への続く転換を測定した。この方法は、Sakai., J.Bio.Chem. 264:9980-9988(1989)及びWil

dgooseなど., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 87:7290-7294 (1990) により記載される方法の変法である。ヒヒSMCは、University of Washington, Seattle, WAから得られ、そして大動脈移植片から培養された。ヒ

ヒSMCは、10%ウシ胎児血清により補充されたDMEM培養培地200ml/ウェルにおいて8,000個の細胞/ウェルの濃度で96-ウェル培養皿にプレートされ、そしてこの培地において、37℃で4日間、5%CO<sub>2</sub>下で維持された。アッセイの時点で、10mlの培養培地を除去し、そして上昇する濃度のFVII<sub>a</sub>、又はDEGR-FVII<sub>a</sub>と共にFVII<sub>a</sub>をウェルに添加した。5nM-0.04nMの範囲であるFVII<sub>a</sub>濃度の標準曲線を生成した。FVII<sub>a</sub>活性に対するDEGR-FVII<sub>a</sub>の阻害活性を測定するために、上昇する濃度のDEGR-FVII<sub>a</sub>を、一定量のFVII<sub>a</sub> (5nM)の存在下で試験ウェルに添加した。FVII<sub>a</sub>及びDEGR-FVII<sub>a</sub>の両者を、HEPES緩衝液(10mMのHEPES、137mMのNaCl、4mMのKCl、5mMのCaCl<sub>2</sub>、11mMのグルコース、0.1%のBSA)により希釈し、そして10×原液10mlを細胞に添加した。細胞を試験化合物と共に37℃で2時間インキュベートし、次に、HEPES緩衝液により3度洗浄した。次に、トリス緩衝液(25mMのトリス、pH7.4、150mMのNaCl、2.7mMのKCl、5mMのCaCl<sub>2</sub>、0.1%のBSA)中、第X因子の200nM溶液50μlを個々のウェルに添加した。室温で4分後、0.5MのEDTA 25mlを添加し、第X因子の第X<sub>a</sub>因子への転換を停止した。トリス緩衝液中、0.8mMのS-2222、すなわち第X<sub>a</sub>因子特異的色原体基質25μl/ウェルを添加し、そして405nmでの吸光度を、Thermomaxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA)において、60分後、読み取った。

図3に示される結果は、FVII<sub>a</sub>処理されたウェルに関して、アミド分解活性の用量依存性上昇を示す(空白の四角)。吸光度の上昇は、ウェルにおいて生成される第X<sub>a</sub>因子、及び色原体基質のその続く分解のレベルの直接的測定である。一定量のFVII<sub>a</sub> (5nM)と共に上昇する量のDEGR-FVII<sub>a</sub>の添加は、DEGR-FVII<sub>a</sub>の上昇するレベルに伴って、アミド分解活性における用量依存性下降を示した

(黒の四角)。等モル比のDEGR-F VII<sub>a</sub> : F VII<sub>a</sub> は、色原体活性の90%以上を阻害することができた。10倍低いレベルのDEGR-F VII<sub>a</sub> でさえ、第X<sub>a</sub> 因子色原体活性の生成において40%の阻害率がまだ存在した。それらの結果は、DEGR-F VII<sub>a</sub> が、SMCの損なわれていない細胞単層の表面上でのF VII<sub>a</sub> による第X<sub>a</sub> 因子への第X因子の活性化の非常に可能性あるアンタゴニストである結論を支持する。

#### 例 X IV

ヒトにおける血管血栓形成及び血管損傷形成に対するDEGR-第VII<sub>a</sub> 因子の効果

ヒトDEGR-第VII<sub>a</sub> 因子を、非ヒト霊長類において機械的血管損傷により誘発された血管損傷形成(VLF)における組織因子(TF) 及び活性化された第VII因子(F VII<sub>a</sub>) 介入を阻害する能力について試験した。

ヒトにおいて機械的血管損傷を形成する前、DEGR-第VII<sub>a</sub> 因子を、7日(5匹の動物)又は30日(1匹の動物)間、静脈注入した。測定は、30日目、血管損傷形成のために実施された。5匹の処理された動物における結果を、5匹の同時にビークル緩衝液を注入された対照における発見と比較した。

次のものに関する基準測定値を、研究動物に基づいて得た：a) 血小板計数、好中球計数、単球計数及び赤血球細胞計数；b) 血漿フィブリンノーゲンレベル；c) 血漿凝固第VII, VII<sub>a</sub>, X 及びV 因子の活性レベル及びF VIIの抗原性レベル；及びd) 抗-第VII<sub>a</sub> 因子抗体レベルのための基準血漿サンプル。

ハロタン麻酔及び無菌操作条件下で、自己由来の<sup>111</sup>In-血小板によりラベルされた動物は、連続した静脈内注入のためのテーターシステムを用いてDEGR-F VII<sub>a</sub> の静脈内注入を受けた(1 mg/kgの初期ボース注入、50mg/kg/時の続く連続した静脈内注入)。動

物は、手術による頸動脈血管内膜切除、左右上腕動脈又は左右の大腿動脈Fogartyバルーンカテーテル血管形成法を受けた。

DEGR-F VII<sub>a</sub> を、テーターシステムを用いて静脈カテーテルを通しての連続的注入により7又は30日間投与した。手術後30日で、動物片ハロタンにより麻酔をかけ、そして動物は、0.1%のグルタルアルデヒドを含む4%パラホルムアル

デヒドによる30分間の現場圧力ー注入固定化を受けた。この時点で、血管断片（前に損傷を受けた部位を含む）を、Harkerなど., Circulation 83:41-44 (1991) 及びHansonなど., Hypertension 18:1170-1176 (1991) の方法を用いて収獲した。検体を、インビトロで後一固定化し(0.1%のグルタルアルデヒドを含む4%パラホルムアルデヒド)、低温保存し、そして損傷程度の形態学的分析のために加工した。

11匹の通常の成熟ヒヒ(Paio anubis)を研究した。6匹の動物は、DEGR-F VII a 注入(50mg/kg/時)を受け、そして残りの5匹の動物はDEGR-F VII a を受けていない対照動物であった。動物を駆虫し、そして使用の前、3カ月間、疾病を有していないことを観察した。すべての工程は、Institutional Animal Care and Use Committeeにより許可されており、そしてGuide for the Care and Use of Laboratory Animals、及びAnimal Welfare Act並びに関連する制度化した方策により概略されている工程及び方法に従った。挿入工程は、ケタミン(10mg/kg、筋肉内)及びバリウム(0.5mg/kg、静脈内)による誘発の後、ハロタン麻酔下で実施された。実験工程を手術後に実施することにおける続く短期間の固定化のためには、ケタミン塩塩酸(5~20mg/kg、筋肉内)を使用した。

頸動脈血管内膜切除を、Hansonなど., Hypertension 18:1170-1176 (1991) 及びKrupskiなど.; Circulation 84:1749-1757(1991)(それらは引用により本明細書に組込まれる)の技法を用いて、

首の中央の切開を通して実施した。血管内膜切除法を、その臨床学的な適切性のために、及び通常の動脈の血管内膜切除により誘発されるVLFは再生できることが知られているので、血管損傷モデルとして使用した。手短に言及すると、共通する頸動脈を、近位鎖骨から遠位頸動脈分岐まで切開し、まわりの組織を除去した。共通する頸動脈を、ヘパリンスルフェートのボラス注入(100U/kg、静脈内; Elkins-Simm Inc., Cherry Hill, NJ)の3分後、暴露された血管の個々の端で配置される血管クランプを用いてクロスクランプし、そしてそのクロスクランプ側の1cm近位で分けた。次に、近位動脈断片を、曲がった鉗子上で裏返した。最大の外転が得られた後、一对のポリプロピレン縫合糸(7-0)を、いずれか

の側の近位端上に配置し、そして第2の対の縫合糸を管腔—暴露された断片の遠位端に配置した。次に、血管内膜切除を、裏返えされた血管断片の分けられた端から1 cmで行ない、そして測定された1 cmの距離まで続けた。この工程は、手術用顕微鏡（32倍の倍率）及び鉗子を用いて正常な内膜及び部分的な厚さの中膜の機械的除去を包含する。血管内膜切除に続いて、血管をその正常な形状に戻し、そして端から端の吻合を7-0のポリプロピレン縫合糸及び2.5倍の倍率下での連続技法により実施し、そして創傷を重ねて閉じた。

VLFの形態計測分析に関しては、パラフィンに包埋され、そして結合組織成分（コラーゲン、エラスチン）のためにヘマトキシリン—エオシンにより着色された切片を、高解像度（700ライン）のモニターに連結される高解像度（580ライン）CCD顕微鏡カメラ、IBM386チップ、像獲得のためにデジタル化できる高解像度図を有する80MBコンピューター及び貯蔵から成る像分析システム（Thomas Optical Measurement Systems, Columbus, GA）と連結されるZeiss Photoscopeを用いて評価した。定量的な像分析を、形態計測ソフトウェアド

ライバー（Optimas, Bioscan, Inc., Edmonds, WA）を用いて実施した。動脈横断面を、新内膜の増殖性損傷の合計面積及び動脈中膜の対応する面積に関して分析した。統計学的分析のために、グループ間の比較が、対及び不對のデータのためのStudent'sテスト（両側）を用いて行なわれた。

その結果は、内膜面積が、同じ血管損傷を受けているが、しかしいづれのDEGR—第VII a 因子も得ていない対照動物に比較して、DEGR—第VII a 因子により7日間処理され、そして30日目で研究された動物において有意に低められたことを示した（図4）。類似する結果が、DEGR—第VII a 因子により30日間処理され、そして30日目で実験された動物において見出された。

バルーン血管造影上腕動脈モデルによる予備研究は、DEGR—第VII a 因子療法の測定できる利益を提供しなかった。しかしながら、このモデルは、組織因子がキー役割を演じる前血栓症モデルであることがヒヒにおいては示されていない。

ヒヒにおける大腿動脈バルーン損傷に関する研究は、図5に示されるように、対照に比較して、DEGR—第VII a 因子からの統計学的に有意な利益性を示した。

## 例XV

## tPA—誘発された血栓崩壊に対するDEGR—第VIIa因子の効果

急性心筋梗塞の間の進行性冠状動脈血栓形成は、外因性凝固経路を通して第VIa因子と複合体化する組織因子(TF)により主に仲介される。組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)血栓崩壊の効能に対する外因性経路における異なった点での付属する凝固カスケード阻害の効果を決定した。

tPA(20分間にわたって1mg/kg)による血栓崩壊を受ける電氣的に誘発された冠状動脈血栓を有する36匹の犬は、次の4種の付属す

る処置の1つを与えられた：9匹の犬は90分間、30mg/kg/分で、ダニ抗凝固ペプチド(TAP)、すなわち選択的な第Xa因子インヒビターを受けた。TF—第VIIa因子複合体を、9匹の犬において組換え組織因子経路インヒビター(TFPI)(90分間100~150mg/kg/分)により、及び9匹の犬において活性化された第VIIa因子の競争アンタゴニストとしてDEGR—VIIa(1~2mg/kgのボラス)により阻害した。9匹の犬は、塩溶液を受けた。犬を、再閉塞に関して、血栓崩壊の後120分間、観察した。血栓崩壊の効能に対するそれらの剤の効果が表18(平均±SDとしてのデータ)に示されている。

表 18

	塩溶液	DEGR-FVIIa	TFPI	TAP
再流までの時間(分)	32±13	20±7 *	21±6 *	18±10*
再流の持続時間(分)	62±45	70±48	91±35*	120
サイクル流変動	70%	89%	56%	0%
再閉塞	70%	78%	67%	0%

\* : 0.05%の有意性レベルでの塩溶液対照と異なる値。

それらのデータは、DEGR—VIIa又はTFPIによる第Xa因子又はTF—第VIIa因子遮断による外因性経路阻害がtPA—誘発された血栓崩壊を促進せしめたことを示す。第Xa因子の選択的阻害は、好結果をもたらす再灌流に続く動脈開通性を

より効果的に維持した。

#### 例XVI

修飾された第VIIa因子は、全身性凝固に影響を及ぼさないで血管内血栓形成を阻害する

TFに結合する第VII因子の阻害が抗血栓効果をもたらすかどうかを決定するために、再発性血栓形成によるサイクル流変動(CFV)を、

内皮損傷されたウサギ頸動脈(Fottのモデル)のまわりに外部緊縮体を配置することによって開始せしめた。頸動脈血流を、その緊縮体の近くに配置されるDoppler流動プローブにより連続して測定した。前記動脈のまわりに緊縮体を配置した後、CFVは6匹すべてのウサギにおいて $11 \pm 2$ サイクル/時の平均頻度を伴って進行し、ところが頸動脈血流速度はCFVの最下点で、平均して、基準値の $5 \pm 2\%$ であった。CFVを30分間観察した後、動物はヒト組換え活性部位-ブロックされた(Phe-Phe-Argクロロメチルケトン)第VIIa因子(FVIIai)(10分間、 $0.1\text{mg/kg}$ /分)の注入を受けた。第VIIai因子は、6匹すべての動物においてCFVを完全に破壊した(CFV頻度 = 0サイクル/時、 $p < 0.05$ ; 頸動脈血流速度 = 基準値の $106.9\%$ ;  $p = \text{NS vs. 基準}$ )。CFVの阻害の30分後、ヒト組換えFVIIaを、10分間、 $0.1\text{mg/kg}$ /分の用量で注入した。第VIIa因子の注入はすべての動物においてCFVを復帰させ、従って、TFに結合する第VIIa因子が競争性であることを示した。プロトロンビン時間、活性化された部分トロンボプラスチン時間、及びADP及びトロンビンに応答してのエキスピボ血小板凝集は、基準値に比較して、FVIIai注入の後、異ならなかった。従って、FVII-VIIaは、インビボでの血栓形成の開始において重要な役割を演じる。第VIIai因子の投与は、全身性凝固に影響を及ぼさないで、このモデルにおいて可能性ある抗血栓効果を発揮する。

#### 例XVII

修飾された第VIIa因子の局所投与による微小動脈血栓症の阻害

血管手術、微小血管再構成手術、又は再移植手術において、不全の最とも共通する原因は吻合部位での血栓症である。閉塞性血栓形成の危険性は、血管が外傷にゆだねられ、病理学的変化を表わし、又は挿入静脈移植片が使用される場合、



非常に高められる。従って

、手術による抗血栓介入が時おり使用される。現在入手でき、そしてこの指示に基づいて使用される物質は、非経口（ヘパリン、デキストラン）又は経口(ASA)投与され、そして出血副作用にすべて関連している。さらに、ヘパリン及び特にASAは、（動脈）血栓形成の防止において単なる部分的な効果を有する。それらの欠点に基づいて、局部的に供給され得る物質により吻合領域及び血管外傷の部位に結合し、そしてそこにおいて効果的である（それにより、所望しない全身性副作用を回避する）剤を用いて、血管手術における血栓症を防止する必要性が存在する。この実験においては、動脈外傷部位での活性部位不活性化された第VII a 因子の局部投与が、高められた出血又は他のうっ血性欠損の傾向を誘発しないで、抗血栓効果を生成するために使用された。

#### 方法：

約3.5kgの体重のスウェーデン製ウサギ（いずれかの性別）に、標準のペレット食物を供給し、そして水を任意に与えた。それらの動物は、使用の前、少なくとも1週間、実験室において疾病を有さないことが観察された。

耳周縁の静脈にカニューレ挿入し、そしてナトリウムペントバルビタール（18 mg/kg）により麻酔をかけ、そして反復の注入により維持した。

皮膚弁を両耳に上げ、そして中央の動脈の3 cmの長さの断片（外径－1 mm）を調製した。すべての枝を10－0縫合糸により連結し、そして切断した。手術部分を等張塩溶液により洗い流し、そして薄いプラスチックフィルムにより被覆した。血流を高く且つ一定に維持し、そして血管攣縮を妨げるために、動物をヒートパッド上に置き、そして約39.5℃（正常な体温＝約38.5℃）の体温でのわずかな高体温で維持し、そしてリドカイン3滴（10mg/ml）を、それらを

操作した後（再灌流後、及び再灌流後30分での開通性の試験の後）、血管に局所的に適用した。

両側上の血管を、二重微小血管クランプ（S & T2V, S & TMarketing Ltd., Neuhausen, Switzerland）に同時に配置し、それにより、クランプ間の7 mmの動脈

断片を単離した。縦の動脈切開（7mm）を行ない、この後、クランプを近づけ、血管の位置を変え、そして血管腔を裏返し、そして平らにし、中膜の深い層を暴露した。動脈切開部分を、連続した10-0モノフィラメントナイロン縫合糸（Ethilon 10-0 BV-75-3, Ethicon Ltd., Edinburgh, U.K.）により閉じた。すべての手術工程は、高性能の手術用顕微鏡（Wild M-650, Leica-Heerbrugg, Heerbrugg, Switzerland）を用いて1人の外科医により実施された。

血管を、血管クランプを開放することによって同時に再灌流した。それらは、塩溶液によりソークされたガーゼパッドによりすばやく被覆され、そして再度、検査された。動脈切開による出血の完全な停止までの時間を記録した。

再灌流後、30及び120分で、血管開通性を、次の標準の顕微手術の空／再充填試験を用いて評価した：血管を、一対の微小鉗子により外傷部分の遠位端を閉塞し、そして他の対の鉗子により下流を空にした。最初の対の鉗子の開放の後、血管再充填を評価し、そして血管を開通性又は閉塞されたとして分類した。閉塞された血管は再充填を示さなかったが、ところが開通性の血管は、急速な又は遅い再充填を示し、ここで後者は“減じられた開通性”として言及される。最後の開通性試験の後、血管を摘出し、そして縦に開き、この後、血栓材料を除去し、そして重量を計った。

#### 化合物：

3.1mg/mlの濃度での化学的に不活性化された組換えヒト第VIIa

因子（VIIa）、又はビークルが、コードを付けられたバイアルにおいて200mlのアリコートとして貯蔵された。

#### 実験プロトコール：

20匹のウサギを、盲目ランダム態様で次の通りにして処理した（個々のウサギは、それ自体の対照として作用する）：上記方法セクションに記載されるように深動脈外傷を実施した後、一方の耳上の暴露された外傷部位を、VIIai溶液（合計0.5mg）により5分間、洗い流し、そして他方の耳上の外傷部位をビークルにより洗い流した。洗い流された外傷部分を、さらに5分間、前記溶液と共にインキュベートし、その後、すべての過剰の溶液を等張塩溶液によりフラッシュし、除去

した。次に、動脈切開部分を閉じ、そして血管を再灌流した。

#### 統計学的方法：

開通性の結果を、徴候試験及び血栓の重量を用いて比較し、そして動脈切開出血データをWilcoxon試験により比較した。両側検定p値を表わした。

#### 結果：

VIIaiの投与は、開通速度により測定される場合、明確な抗血栓効果を付与した。VIIaiグループにおいては、血管開通度は再灌流の後、30分で85%及び120分で75%であった。ピークルグループにおけるそれらの対応する値は、それぞれ40%及び30%であった。前記差異は、統計学的に有意である（それぞれ、 $p = 0.008$ 及び $p = 0.004$ である）。平均血栓重量は、VIIaiグループにおいて0.3mgであり、そしてピークルグループにおいて0.5mgであったが、しかしこの差異は有意ではなかった（ $p = 0.19$ ）。平均動脈切開出血時間は、VIIaiグループにおいて1.5分及びピークルグループにおいて2分であった。前記グループは統計学的に、区別できない（ $p = 1$ ）。

この例は、動脈損傷部位でのVIIaiの局部投与が、高められた出血の傾向を誘発しないで、抗血栓効果を生成することを示す。これは、手術、血管の顕微手術、血管形成又は他の損傷による血栓合併症を妨げるための処理の高い魅力のある態様を示す。

#### 例 X VII

FVIIa<sup>1</sup>の局部適用は血栓重量を減じ、そして開通性を改良する

この例は、化学的に不活性化されたFVII<sub>a</sub> (FVIIai)の局部適用が血栓重量を減じ、そして血管開通性を改良することを示す。

麻酔をかけられた20匹のウサギをこの例において使用した。頸静脈を移動し、そして10mmの断片をクランプ間から単離した。血栓を、単離された断片の内皮の化学的（アエトキシスクレロール）破壊及び前記断片の末端に配置された半制限結紮の組合せにより導入した。盲目ランダム態様において、一方を0.5mgの化学的に不活性化されたFVII<sub>a</sub> (FVIIai)により処理し、そして他端を緩衝液により処理した。試験物質を単離された断片に注入し、そして化学的破壊の後、10分

間インキュベートした。30及び120分後、開通性を、空／再充填試験により検査した。可能な血栓を、殺した後、重量を計測した。

	平均 血栓の 重量	血栓の 重量の 範囲	p-値	30分後 の開通度	p-値	120分 後の 開通度	p-値
FVIIai	0.85mg	0-22.3mg	0.035	90%	0.0070	85%	0.070
緩衝液	9.3mg	0-26.8mg		55%		50%	

前記結果は、不活性化されたFVIIaの局部適用が、静脈血栓症モデルにおいて、血栓重量を有意に減じ、そして開通性を改良したことを示した。

#### 例XIX

FVIIaiの適用は危険領域を減じ、そして再灌流を改良する方法：

##### 実験準備：

両方の性の28匹のNew Zealand白ウサギ(3.2~3.8kg)を研究した。手短に言及すれば、動物を、筋肉内投与される、ケタミン (35mg/kg) 及びキシラジン (5mg/kg) の混合物により麻酔をかけ、挿管し、そして一定体積のレスピレーター (Harvard Apparatus Co., Cambridge, MA) により通気した。ポリエチレンカテーテルを、それぞれ動脈圧及び薬物の投与をモニターするために、左頸動脈を通して大動脈に及び頸静脈中に配置した。開胸を、5番目の左肋間空間を通して行ない、そして心膜を開いた。ポリエチレンカテーテルを、着色された微小球の後での注入のために、左動脈付属物中に配置した。回施冠状動脈の大きな周囲ブランチを、手術用縫合糸スネアによりその起点から約0.3cmの場所を一時的に閉塞した。冠状動脈閉塞を30分間、維持し、この時点で、結紮を開放し、そして再灌流をさらに5.5時間、可能にした。全身の動脈圧 (Statham P23 DB圧力トランスデューサー) を、実験の間、連続して記録した (Gould Instruments)。

##### 実験プロトコール：

再灌流の時点で、動物を次の処理グループの1つにランダムに割り当てた：左心房中に塩溶液の5mlボラスを受けた対照グループ；活性部をブロックされた、ヒト組換え第VIIa因子(FVIIai, Novo Nordisk A/S, Gentofte, Denmark、左

心房中への1 mg/kgボラス)により処理されたグループ;活性化されたヒト組織換え第VII<sub>a</sub>因子(FVIIa, Novo Nordisk A/S, Gentofte, Denmark、左心房中への1 mg/kgボラス)により処理されたグループ。

危険領域、梗塞の大きさ、及び非再流動現象の評価:

実験の最後での組織灌流の分布(再流なし現象、NR)を評価する

ために、動物は、左動脈カテーテルを通してチオフラビンS(1 mg/kg)の6%溶液の注入を受けた。梗塞の危険領域の評価を可能にするために、冠状動脈を、チオフラビンの注入の直後に再閉塞し、そしてモナストラールブルー(E.I.DuPont: 1 mg/kg)の溶液を、左動脈カテーテルを通して注入した。その後、心臓をすぐに切り出し、そして左心室を切開し、他のすべての構造体を除去し、そして重量を計測した。左心室を-70℃で30分間、凍結し、そして房室性溝に平行して8~10個のスライスを切断した。通常灌流された心筋層及び危険領域の外形を、モナステラルブルーの分布に従って、透明なプラスチックシート上で追跡した。心筋スライスを紫外線下で観察し、そして通常に灌流された心筋(蛍光)を、チオフラビン分布に従って、虚血性心筋(非蛍光)から容易に分化し、そして分離した。これらの領域もまた透明なプラスチックシート上にトレースした。次に、スライスを37℃で10分間、トリフェニルテトラゾリウムクロリド(TTC, Sigma Chemical)の2%の溶液においてインキュベートし、壊死領域を可視化した。再び、透明なプラスチックシートを用いて、正常な心筋層(TTC-陽性)及び梗塞された部分(TTC-陰性)の外形を追跡した。

次の変数を計算した: 1) 再灌流期間の最後で評価される(モナストラールブルーの分布)、左心室の%としての梗塞の危険性領域(AR); 2) TTC染色基準による、壊死に实际的に進行した危険性領域の%としての梗塞サイズ(IS); 3) 再灌流期間の最後で血流を受けなかった(非再流動現象、NR)危険性領域の百分率。

局部心筋血流測定:

局部心筋血流(RMBF)を、個々の処理グループにおけるすべてのウサギにおいて測定した。種々に着色されたプラスチック微小球(Blue, Red, and Yellow, Tr

iton Technology, San Diego, CA)を用

いて、閉塞の20分後、及び再灌流の10分及び5時間後、RMBFを測定した。

微小球は、 $15 \pm 1 \mu$ のサイズであり、そして0.01%のTween 80を含む10%デキストラン溶液に懸濁された。適切な分散性を確かめるために、微小球を、使用の直前、5分間、超音波槽において音波処理した。約500,000の微小球(0.5~1.0mlの合計体積)を、左動脈カテーテル中に注入した。微小球注入の1分前、対象の動脈血流の抜き取りを始め、そして注入の後、1分間続けた。虚血性領域及び非極性領域からの組織サンプル(100~300mg)をTTC染色に従って採取した。次に、微小球を、製造業者により提供される説明書に従って、4 MのKOH溶液においての72℃での3時間の消化により組織から、及び16MのKOHにおいての室温での3時間の消化により対照から回収した。次に、色素を既知体積の溶媒(ジメチルホルムアミド)内の球体から回収し、そしてその濃度を製造業者の説明書に従って、個々の色素についての最適波長で分光光度計により決定した。個々の色素溶液の構成成分スペクトルを、マトリックス転位技法により単一構成成分のスペクトルに分解した。個々の心筋サンプルに対する血流を次の式により計算した： $RMBF = Fr \times Am / Ar$ 、ここでRMBF=ml/分での心筋血流、AM=心筋サンプルの吸光度及びAR=対照血液サンプルの吸光度。心筋血流をサンプル湿量により割り算し、そしてml/分/gとして表わした。

凝固研究：

全身性凝固に対するFVIIa<sub>i</sub>及びFVII<sub>a</sub>投与の効果を決定するために、プロトロンビン時間(PT)及び活性化された部分トロンボプラスチン時間(aPTT)を、基準で及び薬物投与後30分で測定した。血液サンプル(4.5ml)を、0.5mlのクエン酸ナトリウム(3.8%)に採取し、そして2000 gで10分間、4℃で遠心分離し、血漿を分離した

。PT及びaPTTを、採血から2時間以内に二重反復測定した。

統計学的分析：

結果を平均±平均のSDとして表わす。分散性の分析を、グループ間での複数の

比較のために使用した。個々のグループについての差異を、Bonferroniの補正を伴って不對の觀察のためのStudent's t-testにより試験した。血行力学変数、並びにグループ間での局部心筋血流の比較のために、反復された測定計画による分散性の分析を用いた。

#### 結果：

28匹のウサギは次の手術工程を受けた：2匹の動物は、処理グループ割当ての前、心室線維攣縮のために冠状閉塞の間に死亡し、そしてさらに2匹のウサギは再灌流の間に死亡した（1匹は対照グループであり、そして他の1匹はFVIIa-処理されたグループにおいてであった）。それらの動物は、続く統計学的分析から排除された。従って、個々の処理グループにおける8匹の動物が、研究に包含された。

#### 血行動態測定：

すべての処理グループにおいて、冠状動脈閉塞は心拍数及び平均動脈圧のわずかな低下を誘発した。実験期間の間、心拍数及び平均動脈圧の差異は、3種のグループ間に見出されなかった（表I）。

#### 危険領域、梗塞サイズ、及び非-再流現象の評価：

冠状動脈閉塞は、3種の処理グループにおいて、類似する実験の最後でのモノストラルブルーの注入により評価される梗塞の危険領域を生成した（それぞれ、対照、FVIIai及びFVIIa-処理された動物における左心室の $31.6 \pm 6.3$ 、 $28.2 \pm 4.1$ 及び $29.2 \pm 5.3\%$ 、 $p = \text{NS}$ ）。

30分間の冠状動脈閉塞及び5.5時間の再灌流の後、壊死に向かっ

て進行する危険領域の量は、対照グループにおいて平均 $59.8 \pm 12.8\%$ であった（図7）。FVIIaiの投与は梗塞サイズを、危険領域の $28.1 \pm 11.3\%$ に有意に減じ（ANOVAによれば $p < 0.01$ 、図1）、そしてVIIaの投与は危険領域の $80.1 \pm 13.1\%$ への梗塞サイズの有意な上昇に関連した（対照及びVIIai-処理されたウサギに対して $p < 0.01$ 、図7）。

対照のウサギにおいては、危険領域の $24.4 \pm 2.7\%$ が、実験の最後でのチオフラビンS分布により決定されるように、灌流欠陥を示した（非-再流現象）。こ

の非一再流領域の程度は、それぞれ、FVIIaiにより危険領域の $11.1 \pm 6.1\%$ に有意に減じられ、そしてFVIIaにより $61.9 \pm 13.8\%$ に有意に高められた ( $p < 0.01$ 、図8)。

これまでの研究は、後一虚血性再灌流の間、灌流欠陥を示す心筋組織の量が、種々のパラメーターに関連しており；最も重要なことは危険領域の程度、梗塞サイズの大きさ、及び閉塞の間、残留する側副流動の量であることを確立した。それらの変数についての研究は、非一再流現象に対する介入の効果のより正確な評価を可能にする。本研究においては、対照ウサギにおける非一再流領域がそれらのパラメーターに相互関連している場合、次の複数次元回帰等式を満たす密接な関係が観察された： $NR$  (左心室 [LV] の%) =  $-14.62 + 0.75 (AR) + 0.07 (IS) + 3.69 (RMBF)$ ； $r^2 = 0.98$ ； $F$  試験 = 109.3、 $(0.37(0.3)(3.69))$ 、ここで $NR$ は非一再流領域であり）、 $AR$ は危険性領域であり、そして $RMBF$ は側副血流である ( $ml / 分 / g$ )。0.98の $r^2$ 値により、このモデルは、この研究において対照動物に観察される非一再流領域における95%以上の変動性を説明した。

複数次元回帰等式における対照ウサギのデータから得られる等式係数を用いて、個々のグループ内の個々の動物のための予測される非一

再流領域を計算した (図9)。FVIIaiを受けるウサギにおける実際に観察される非一再流領域は、複数次元回帰分析から得られる等式を適用して計算される、予測される領域よりも有意に小さかった。実際的に、FVIIai-処理されたウサギにおいて、非一再流のいずれかの与えられる予測領域に関しては、実際の観察される値は、このグループにおけるすべての動物が、対照動物のために得られる回帰線以下に分布するので、小さかった (図9)。対照的に、FVIIa-処理されたウサギはちょうど反応を示した、すなわち非一再流動のいずれかの与えられた予測領域に関しては、実際の観察される値は、すべての動物が対照動物の回帰線以上に分布するので、有意に大きかった (図9)。一緒に考慮する場合、それらのデータは、FVIIaiにより処理された動物に観察される非一再流動現象における低下が梗塞サイズの低下を完全には説明しないことを示し、そして後一虚血性再灌流の間、外因性凝固カスケードの活性化が非一再流現象の発生に寄与することを示唆



する。

局部心筋血流測定：

対照的動物において、非虚血性心筋層へのRMBFは、研究を通して、平均 $1.20\text{ml}/\text{分}/\text{g}$ 組織であった（データは示されていない）。同じ動物グループにおいて、虚血性心筋層へのRMBFは、冠状動脈閉塞後20分及び灌流後10分及び5時間で、それぞれ $0.08 \pm 0.02$ ,  $1.43 \pm 0.28$ 及び $0.98 \pm 0.19\text{ml}/\text{分}/\text{g}$ 組織であった。本研究に使用される種々の薬物処理は、対照動物に比較して、正常及び虚血性心筋層の両者において、実験期間の間、RMBFを有意に変えなかった（図10）。

凝固研究：

出血の高められた危険性を前もって処理できる、FVIIaiの可能な全身性効果を研究するために、PT及びaPTTを、CFVの30分で及びF

VIIai及びFVII a投与の後に収集された血液サンプルにおいて測定した。30分のCFV期間の最後で、PT及びaPTTはそれぞれ、平均 $8.2 \pm 0.6$ 秒及び $25 \pm 3$ 秒であった。 $10.1 \pm 0.6$ 秒へのPTのわずかな上昇が、FVIIai投与の後に観察された（図11）。しかしながら、この上昇は、統計学的有意性に達しなかった（ANOVA、及びBonferroni's補正によるStudent's t-testによれば  $p = 0.09$ ）。APTTは、FVIIai投与後、有意に変化しなかった（図10）。FVII a投与は、FVIIai投与後に得られる値よりも、PT及びaPTTの両者において有意な短縮性をもたらした（図11）。

表 I . 冠動脈閉塞－再灌流の間の血流力学変数

平 均 動 脈 圧 (mmHg)					
閉塞後の時間	対 照	SQ29548	Dazoxiben	R68070	ASA + R68070
0	75 ± 4	78 ± 3	78 ± 4	73 ± 3	7
30分	69 ± 4	65 ± 4	71 ± 3	67 ± 4	6
1 時間	69 ± 3	67 ± 4	71 ± 4	69 ± 4	6
2 時間	73 ± 4	75 ± 4	75 ± 5	72 ± 4	7
3 時間	74 ± 4	75 ± 3	77 ± 5	75 ± 3	7
4 時間	75 ± 5	78 ± 4	76 ± 4	73 ± 4	7
5 時間	73 ± 4	74 ± 5	78 ± 5	72 ± 4	7
6 時間	73 ± 5	76 ± 4	74 ± 5	73 ± 5	7

心 拍 (b / 分)					
閉塞後の時間	対 照	SQ29548	Dazoxiben	R68070	ASA
0	175 ± 5	170 ± 4	178 ± 6	169 ± 5	1
30分	169 ± 4	165 ± 5	173 ± 5	164 ± 6	1
1 時間	169 ± 6	167 ± 4	171 ± 5	166 ± 5	1
2 時間	173 ± 5	172 ± 5	175 ± 6	170 ± 5	1
3 時間	170 ± 4	168 ± 5	177 ± 5	168 ± 6	1
4 時間	175 ± 5	168 ± 6	174 ± 5	169 ± 5	1
5 時間	175 ± 5	172 ± 2	173 ± 5	172 ± 6	1
6 時間	168 ± 5	170 ± 4	174 ± 5	168 ± 5	1

表II. 冠動脈閉塞及び再灌流の間の局部心筋血流

(ml / 分 / g 組織)

	対 照	FVIIai	FVIIa
正常な心筋層			
20分のCAO	$1.19 \pm 0.22$	$1.03 \pm 0.19$	$1.27 \pm 0.24$
10分のREP	$1.22 \pm 0.15$	$1.10 \pm 0.17$	$1.19 \pm 0.20$
2時間のREP	$1.17 \pm 0.18$	$1.07 \pm 0.16$	$1.22 \pm 0.19$
虚血性心筋層			
20分のCAO	$0.09 \pm 0.05$	$0.08 \pm 0.05$	$0.08 \pm 0.04$
10分のREP	$1.53 \pm 0.12$	$1.65 \pm 0.18$	$1.24 \pm 0.14$
2時間のREP	$0.89 \pm 0.14$	$1.23 \pm 0.15$	$0.72 \pm 0.13$

CAO=冠状動脈閉塞；REP=再灌流

#### 例XVIX

FVIIaiの適用は梗塞サイズ及び梗塞の危険性領域を減じる

組織因子暴露は、冠状動脈血管系の後－虚血性心臓の再灌流の間に生じ、冠状動脈血流の低下を導びく。

組織因子暴露が後－虚血性再灌流の間、凝固の活性化、及び冠状動脈血流の低下を通して心筋損傷に寄与するかどうかを決定するために、NZWウサギは、30分間の冠状動脈閉塞、続く、5.5時間の再灌流を受けた。再灌流で、動物はランダムに、次のものを受けた：塩溶液（ $n=8$ ）；ヒト組換えの、活性部位－ブロックされた第VIIa因子（FVIIai、左心房中への10分間の $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$ 、 $n=8$ ）、又はヒト組換えの活性化された第VIIa因子（FVIIa、左心房中への $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$ 、 $n=8$ ）。局部心筋血流（RMBF）を、虚血の20分で、再び再灌流に続いて10分及び2時間で、着色された微小球

を用いて測定した。梗塞の危険性領域（AR）、梗塞サイズ（IS）及び非－再流動領域（NR）を、モナストラールブルー及びチオフラビン分布、及びTTC染色により実験の最後で決定した。FVIIaiは、対照よりもIS及びNRの両者において有意な低下をもたらした（それぞれ、 $28 \pm 11.3\%$ 及び $11.1 \pm 6.1\%$ （AR）対 $59.8 \pm 12.8\%$

及び $24.4 \pm 8.2\%$  (AR)、 $p < 0.01$ )、そして $FVII_a$ はそれぞれ $80.1 \pm 13.1\%$ 及び $61.9 \pm 13.8\%$  (AR)にIS及びNRの両者において対照よりも有意な上昇をもたらした( $p < 0.01$ )。虚血の20分での血圧、心拍、AR及びRMBFの差異は、グループ間には観察されなかった。RMBFは $FVII_{ai}$ -処理された動物において2時間の再灌流で有意に高く、そして $FVII_a$ -処理されたウサギにおいては低かった。従って、凝固でのTF-介入活性化は、後-虚血性再灌流の間、心筋損傷の発生に重大に寄与する。

	$FVII_{ai}$ (AR)	対 照 (AR)	$FVII_a$ (AR)
IS	$28.1 \pm 11.3$	$59.8 \pm 12.8$	$80.1 \pm 13.1$
NR	$11.1 \pm 6.1$	$24.4 \pm 8.2$	$61.9 \pm 13.8$

AR=梗塞の危険性領域；IS=梗塞サイズ；NR=非-再流領域

前述の発明は、より一層の理解のために、例示的且つ例的にいくらか詳細に記載されて来たが、一定の変更及び修飾が本発明の範囲内で行なわれ得ることは明らかであろう。

## 配 列 表

## (1) 一般情報:

(i) 出 願 人: ZymoGenetics, and

Novo Nordisk A/S

(ii) 発明の名称: 修飾された第Ⅶ因子

(iii) 配列の数: 4

## (2) 配列番号1についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長 さ: 2422個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル: N

(iv) アンチセンス: N

(ix) 特 徴:

(A) 名称/キー: CDS

(B) 位 置: 28..1420

(D) 他の情報: /コドン開始=28

/生成物="第Ⅶ因子"

(xi) 配列: 配列番号1:

CCTCCCGACA ATACAGGGGC AGCACTGCAG AGATTTCATC ATG GTC TCC CAG GCC 55

Met Val Ser Gln Ala

-38 -35

CTC AGG CTC CTC TGC CTT CTG CTT GGC CTT CAG GGC TGC CTG GCT GCA 103

Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala

-30

-25

-20

GTC TTC GTA ACC CAG GAG GAA GCC CAC GGC GTC CTG CAC CGG CGC CGG	151
Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg	
-15 -10 -5	
CGC GCC AAC GCG TTC CTG GAG GAG CTG CGG CCG GGC TCC CTG GAG AGG	199
Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg	
1 5 10 15	
GAG TGC AAG GAG GAG CAG TGC TCC TTC GAG GAG GCC CGG GAG ATC TTC	247
Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe	
20 25 30	
AAG GAC GCG GAG AGG ACG AAG CTG TTC TGG ATT TCT TAC AGT GAT GGG	295
Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly	
35 40 45	
GAC CAG TGT GCC TCA AGT CCA TGC CAG AAT GGG GGC TCC TGC AAG GAC	343
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp	
50 55 60	
CAG CTC CAG TCC TAT ATC TGC TTC TGC CTC CCT GCC TTC GAG GGC CGG	391
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg	
65 70 75	
AAC TGT GAG ACG CAC AAG GAT GAC CAG CTG ATC TGT GTG AAC GAG AAC	439
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn	
80 85 90 95	
GGC GGC TGT GAG CAG TAC TGC AGT GAC CAC ACG GGC ACC AAG CGC TCC	487
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser	
100 105 110	
TGT CGG TGC CAC GAG GGG TAC TCT CTG CTG GCA GAC GGG GTG TCC TGC	535
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys	
115 120 125	

ACA CCC ACA GTT GAA TAT CCA TGT GGA AAA ATA CCT ATT CTA GAA AAA	583
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys	
130 135 140	
AGA AAT GCC AGC AAA CCC CAA GGC CGA ATT GTG GGG GGC AAG GTG TGC	631
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys	
145 150 155	
CCC AAA GGG GAG TGT CCA TGG CAG GTC CTG TTG TTG GTG AAT GGA GCT	679
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala	
160 165 170 175	
CAG TTG TGT GGG GGG ACC CTG ATC AAC ACC ATC TGG GTG GTC TCC GCG	727
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala	
180 185 190	
GCC CAC TGT TTC GAC AAA ATC AAG AAC TGG AGG AAC CTG ATC GCG GTG	775
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val	
195 200 205	
CTG GGC GAG CAC GAC CTC AGC GAG CAC GAC GGG GAT GAG CAG AGC CGG	823
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg	
210 215 220	
CGG GTG GCG CAG GTC ATC ATC CCC AGC ACG TAC GTC CCG GGC ACC ACC	871
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr	
225 230 235	
AAC CAC GAC ATC GCG CTG CTC CGC CTG CAC CAG CCC GTG GTC CTC ACT	919
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr	
240 245 250 255	
GAC CAT GTG GTG CCC CTC TGC CTG CCC GAA CGG ACG TTC TCT GAG AGG	967
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg	
260 265 270	

ACG CTG GCC TTC GTG CGC TTC TCA TTG GTC AGC GGC TGG GGC CAG CTG	1015
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu	
275 280 285	
CTG GAC CGT GGC GCC ACG GCC CTG GAG CTC ATG GTC CTC AAC GTG CCC	1063
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro	
290 295 300	
CGG CTG ATG ACC CAG GAC TGC CTG CAG CAG TCA CGG AAG GTG GGA GAC	1111
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp	
305 310 315	
TCC CCA AAT ATC ACG GAG TAC ATG TTC TGT GCC GGC TAC TCG GAT GGC	1159
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly	
320 325 330 335	
AGC AAG GAC TCC TGC AAG GGG GAC AGT GGA GGC CCA CAT GCC ACC CAC	1207
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His	
340 345 350	
TAC CGG GGC ACG TGG TAC CTG ACG GGC ATC GTC AGC TGG GGC CAG GGC	1255
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly	
355 360 365	
TGC GCA ACC GTG GGC CAC TTT GGG GTG TAC ACC AGG GTC TCC CAG TAC	1303
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr	
370 375 380	
ATC GAG TGG CTG CAA AAG CTC ATG CGC TCA GAG CCA CGC CCA GGA GTC	1351
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val	
385 390 395	
CTC CTG CGA GCC CCA TTT CCC TAG C CCAGCAGCCC TGGCCTGTGG	1396
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro	
400 405	



AGAGAAAGCC AAGGCTGCGT CGAACTGTCC TGGCACCAAA TCCCATATAT TCTTCTGCAG 1456  
 TTAATGGGGT AGAGGAGGGC ATGGGAGGGA GGGAGAGGTG GGGAGGGAGA CAGAGACAGA 1516  
 AACAGAGAGA GACAGAGACA GAGAGAGACT GAGGGAGAGA CTCTGAGGAC ATGGAGAGAG 1576  
 ACTCAAAGAG ACTCCAAGAT TCAAAGAGAC TAATAGAGAC ACAGAGATGG AATAGAAAAG 1636  
 ATGAGAGGCA GAGGCAGACA GCGCTGGAC AGAGGGGCAG GGGAGTGCCA AGGTTGTCCT 1696  
 GGAGGCAGAC AGCCCAGCTG AGCCTCCTTA CCTCCCTTCA GCCAAGCCCC ACCTGCACGT 1756  
 GATCTGCTGG CCCTCAGGCT GCTGCTCTGC CTTCAATTGCT GGAGACAGTA GAGGCATGAA 1816  
 CACACATGGA TGCACACACA CACACGCCAA TGCACACACA CAGAGATATG CACACACACG 1876  
 GATGCACACA CAGATGGTCA CACAGAGATA CGCAAACACA CCGATGCACA CGCACATAGA 1936  
 GATATGCACA CACAGATGCA CACACAGATA TACACATGGA TGCACGCACA TGCCAATGCA 1996  
 CGCACACATC AGTGCACACG GATGCACAGA GATATGCACA CACCGATGTG CGCACACACA 2056  
 GATATGCACA CACATGGATG AGCACACACA CACCAAGTGC GCACACACAC CGATGTACAC 2116  
 ACACAGATGC ACACACAGAT GCACACACAC CGATGCTGAC TCCATGTGTG CTGTCCTCTG 2176  
 AAGGCGGTTG TTTAGCTCTC ACTTTTCTGG TTCTTATCCA TTATCATCTT CACTTCAGAC 2236  
 AATTCAGAAG CATCACCATG CATGGTGGCG AATGCCCCCA AACTCTCCCC CAAATGTATT 2296  
 TCTCCCTTCG CTGGGTGCCG GGCTGCACAG ACTATTCCCC ACCTGCTTCC CAGCTTCACA 2356  
 ATAAACGGCT GCGTCTCCTC CGCACACCTG TGGTGCCTGC CACCCAAAAA AAAAAAAAAA 2416  
 AAAAAA 2422

(2) 配列番号2についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 444個のアミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号2:

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Trp Leu Leu Gly Leu Gln

-38

-35

-30

-25

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val			
-20	-15	-10	
Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro			
-5	1	5	10
Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu			
15	20	25	
Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile			
30	35	40	
Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly			
45	50	55	
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro			
60	65	70	
Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile			
75	80	85	90
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr			
95	100	105	
Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala			
110	115	120	
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile			
125	130	135	
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val			
140	145	150	
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu			
155	160	165	170
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile			
175	180	185	

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg			
190	195	200	
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly			
205	210	215	
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr			
220	225	230	
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln			
235	240	245	250
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg			
255	260	265	
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser			
270	275	280	
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met			
285	290	295	
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser			
300	305	310	
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala			
315	320	325	330
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly			
335	340	345	
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val			
350	355	360	
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr			
365	370	375	
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu			
380	385	390	

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro

395

400

405

(2) 配列番号3についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 21個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル: N

(iv) アンチセンス: N

(xi) 配列: 配列番号3:

TGGGCCTCCG GCGTCCCCCT T

21

(2) 配列番号4についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 15個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル: N

(iv) アンチセンス: N

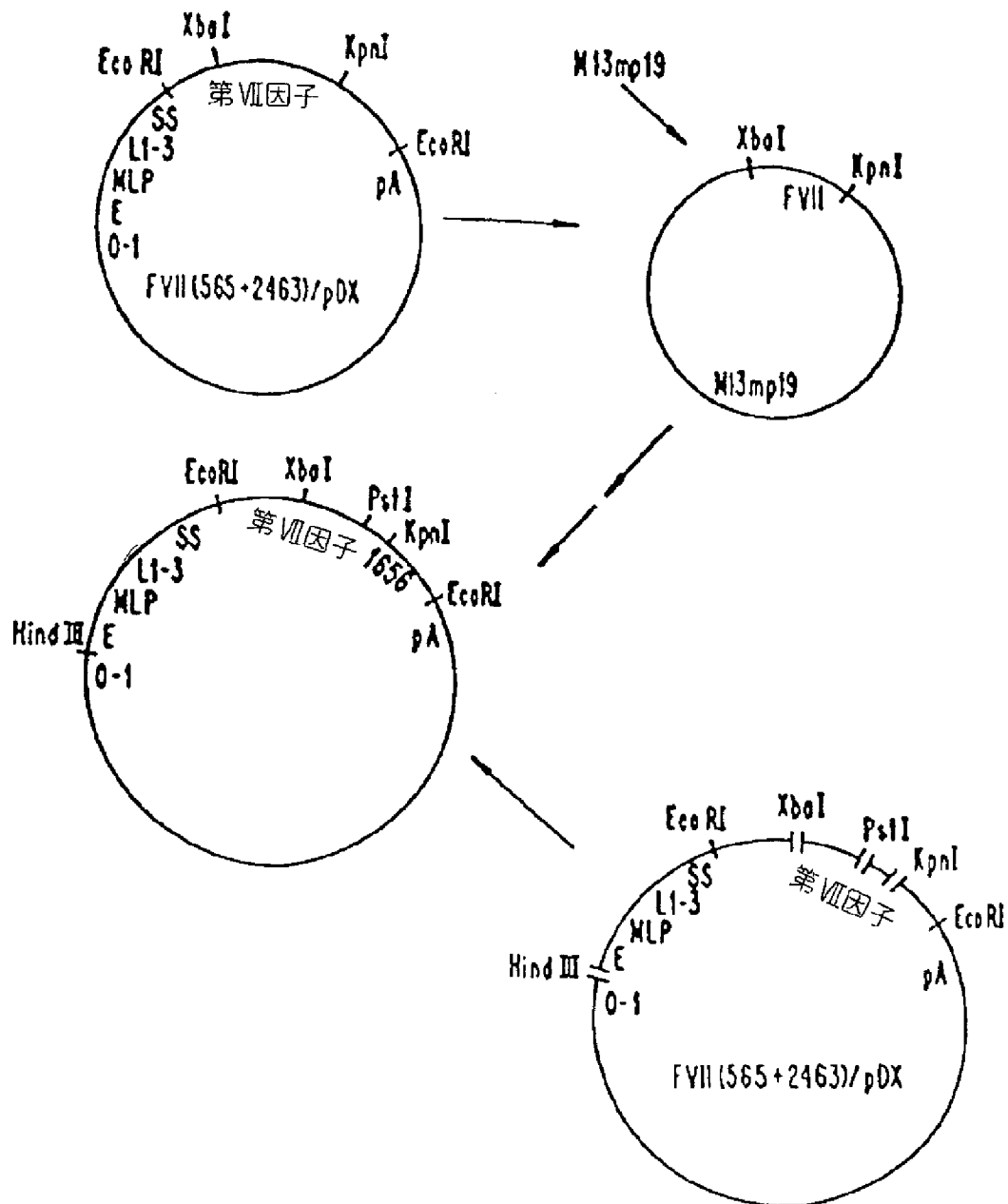
(xi) 配列: 配列番号4:

TCCCAGTCAC GACGT

15

【图1】

Fig. 1



【図2】

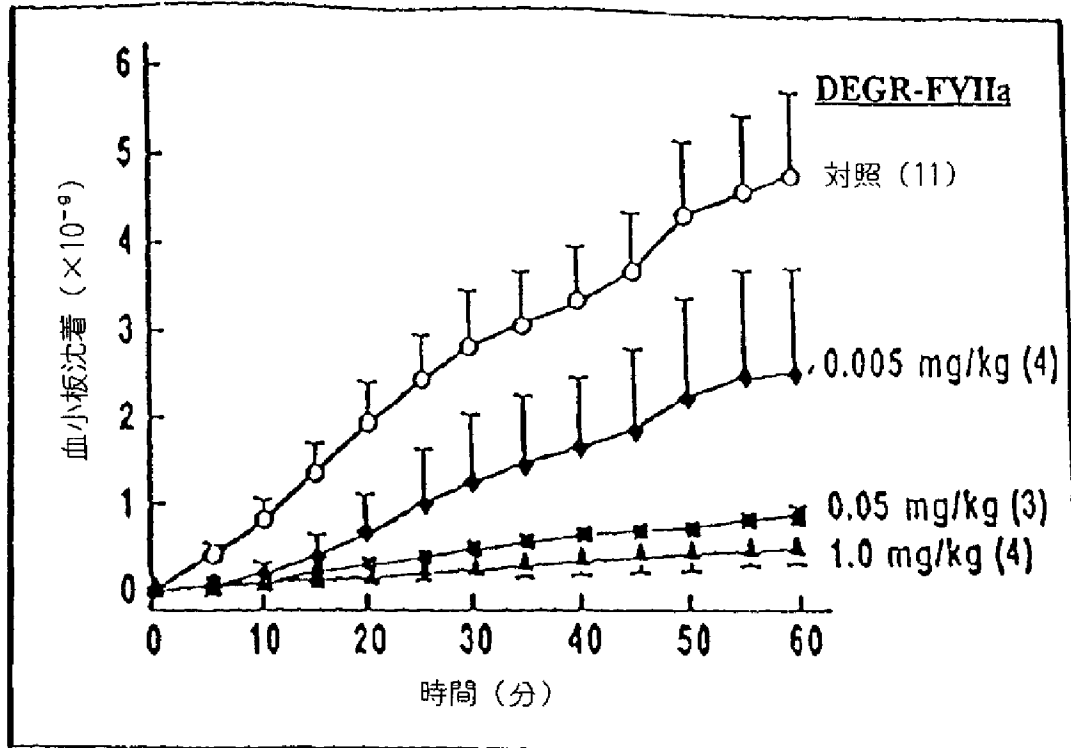
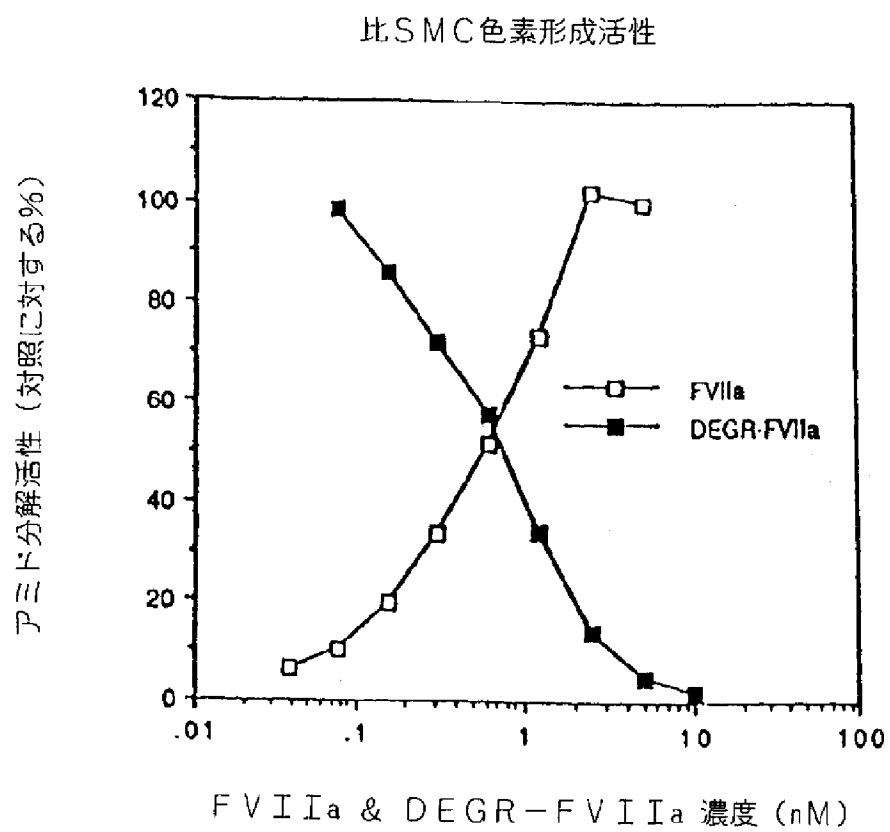


Fig. 2

【図3】

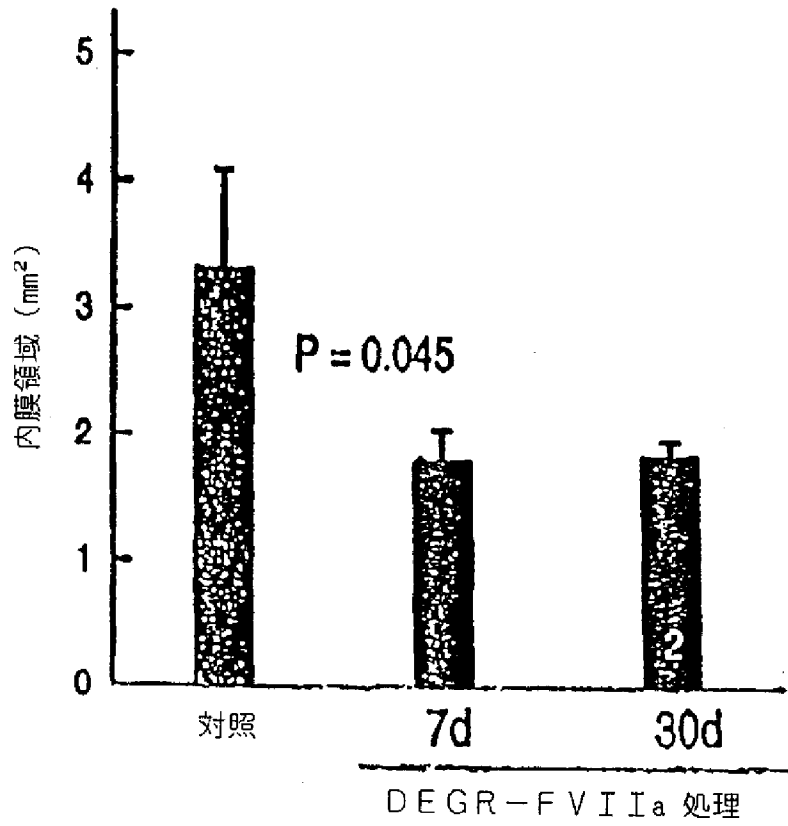
Fig. 3



【图4】

Fig. 4

頸動脈血管内膜切除





【图5】

## 大腿動脈球損傷

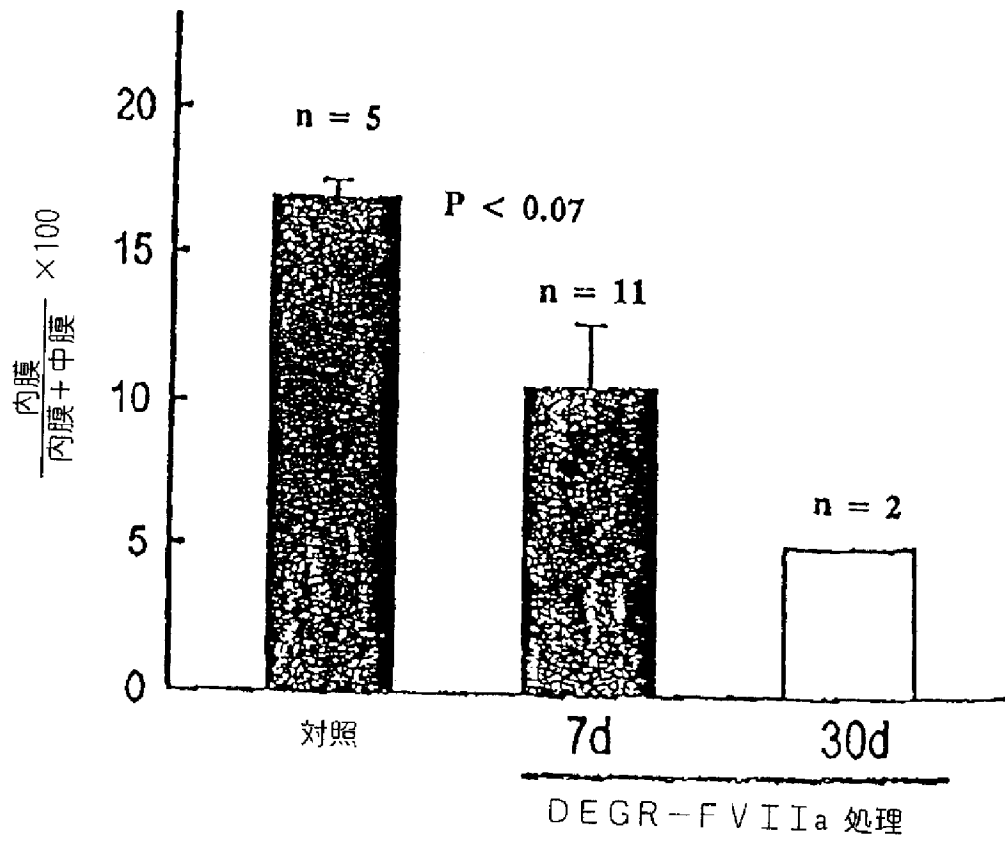


Fig. 5

【図 6】

実験プロトコール

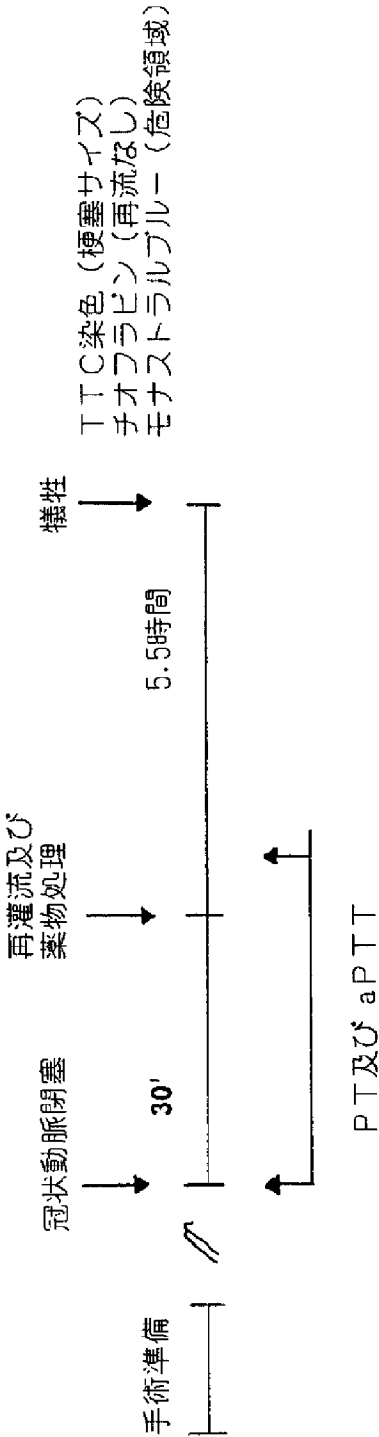


Fig. 6

【図7】

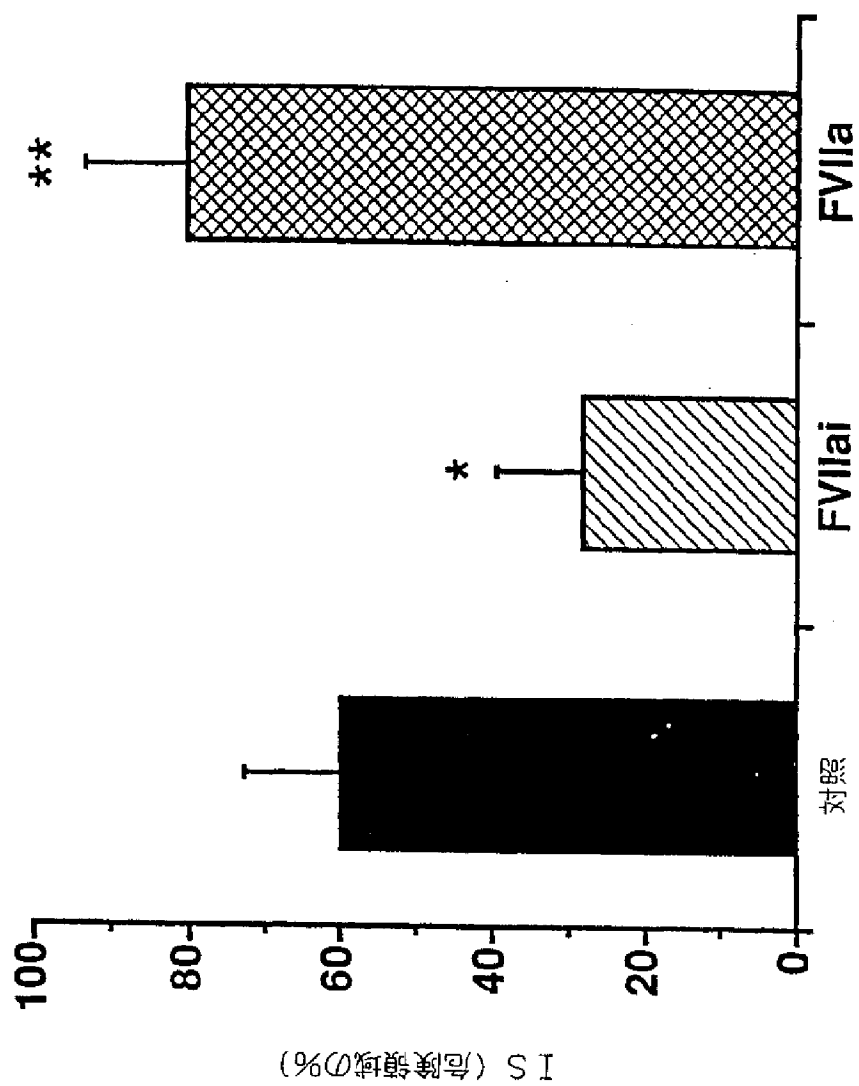


Fig. 7

【図8】

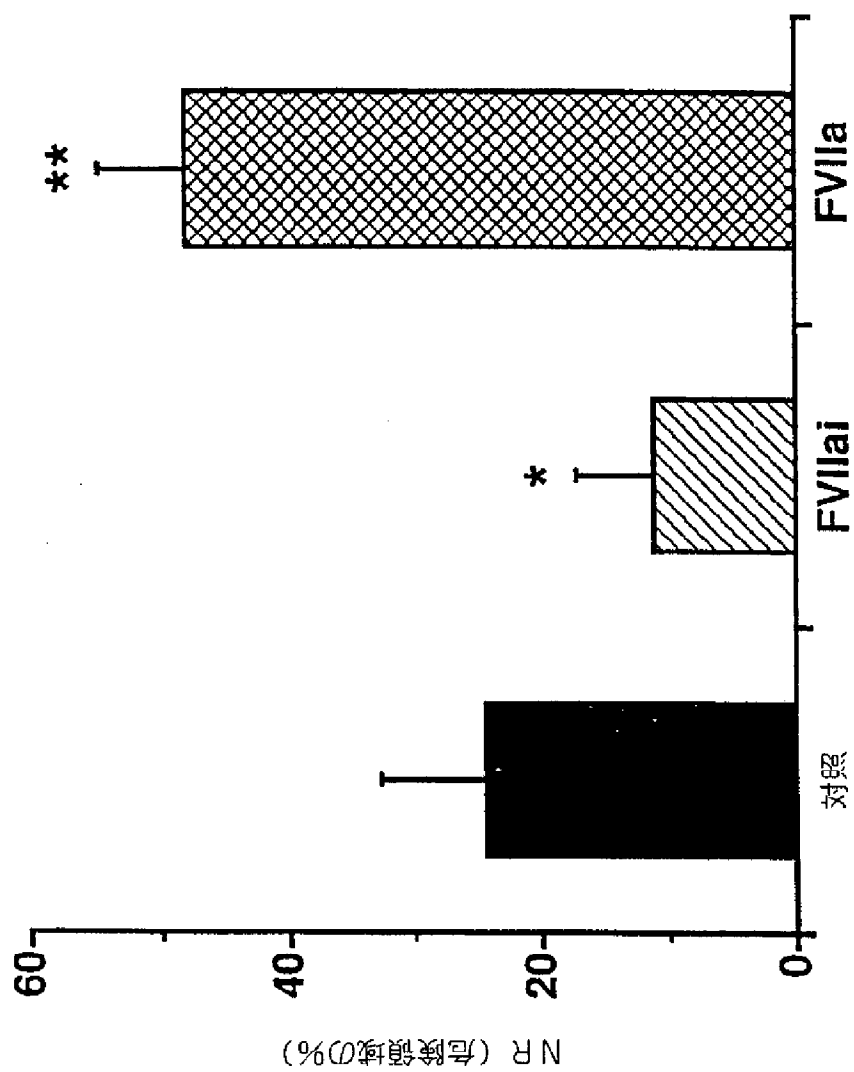


Fig. 8

【図9】

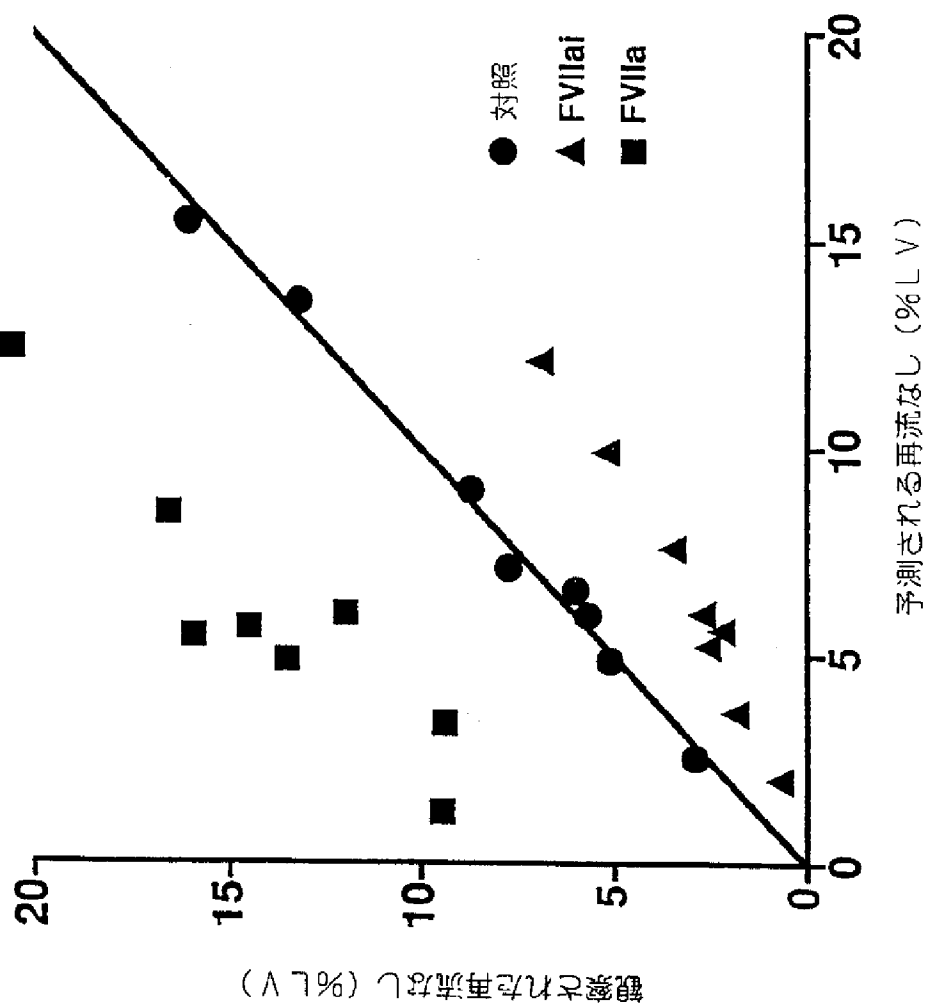


Fig. 9

【図10】

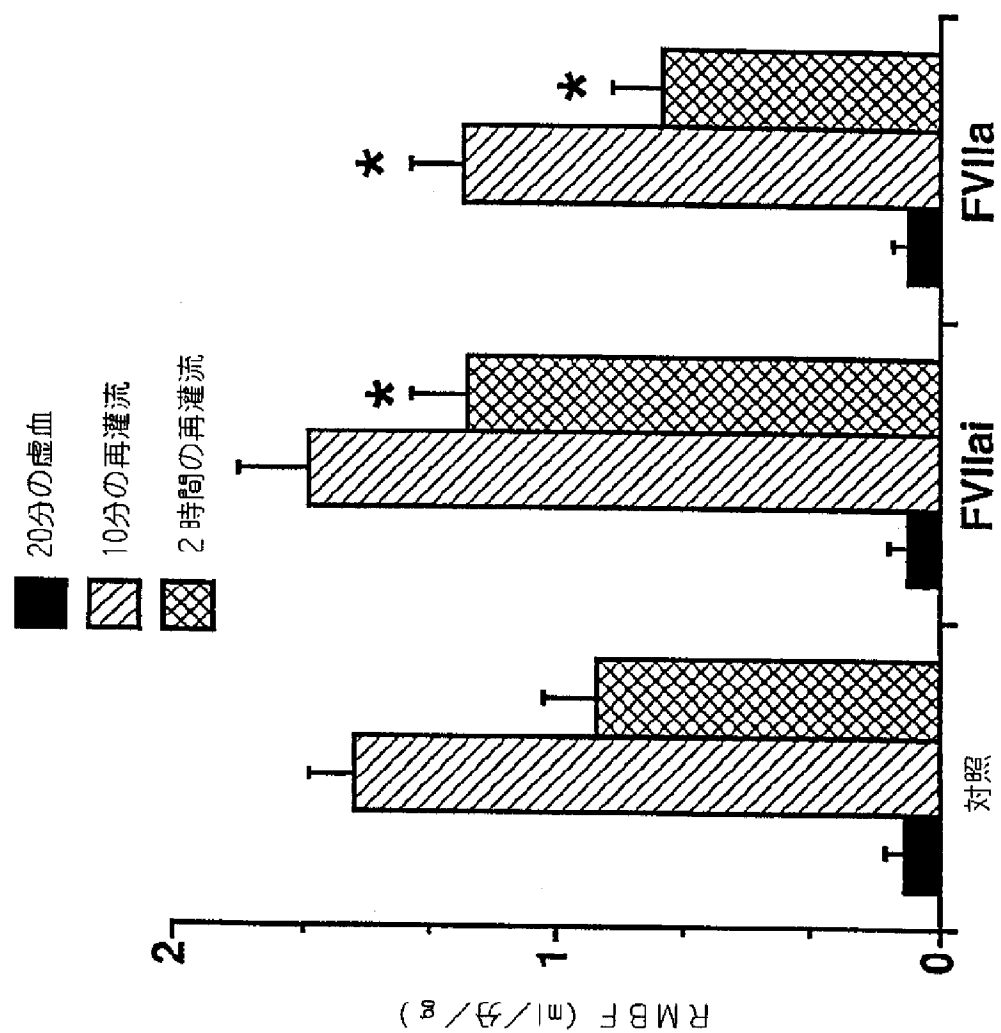


Fig. 10

【図11】

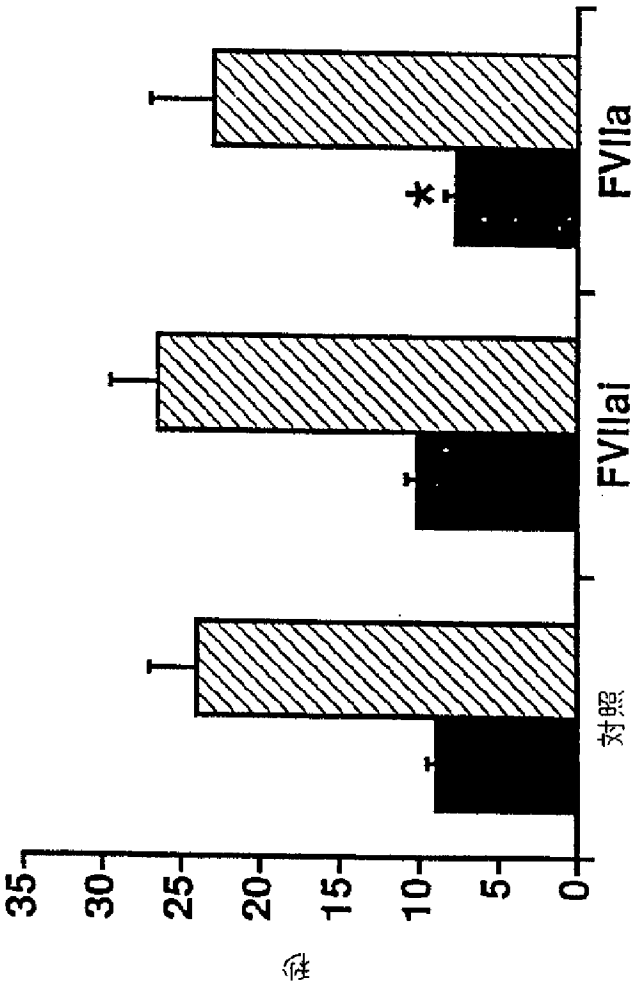


Fig. 11

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 97/00251

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC6: C07K 14/745, A61K 38/36 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC6: C07K, A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI, US PATENTS FULLTEXT, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9215686 A1 (ZYMOGENETICS, INC.), 17 Sept 1992 (17.09.92), page 4, line 9 - line 11; page 5, line 5; page 7, line 6 - line 16, page 14, line 18 - line 28; page 15, line 14 - line 21; page 15, line 27, claims 1-26 --	1-28
X	WO 9427631 A1 (ZYMOGENETICS, INC.), 8 December 1994 (08.12.94), the claims --	1-28
A	WO 9606637 A1 (WASHINGTON UNIVERISTY), 7 March 1996 (07.03.96), page 1, line 6; page 2, line 26 - page 3, line 27; page 4, line 23 - line 24, page 5, line 11 - line 14; page 6, line 15 - line 16; page 10, line 18 - line 20 -- -----	11-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered in be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 Sept 1997		04 -09- 1997
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer  Carolina Palmcrantz Telephone No. +46 8 782 25 00



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 97/00251

**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-10, 16-20, 25-28  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although claims 1-10, 16-20, 25-28 are directed to methods of treatment of the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

06/08/97

International application No.

PCT/DK 97/00251

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9215686 A1	17/09/92	AU 672357 B	03/10/96
		AU 1449892 A	06/10/92
		AU 7192096 A	06/02/97
		CA 2103546 A	29/08/92
		EP 0575464 A	29/12/93
		HU 71572 A	28/12/95
		HU 9302438 D	00/00/00
		JP 6504678 T	02/06/94
WO 9427631 A1	08/12/94	AU 6956094 A	20/12/94
		CA 2162726 A	08/12/94
		EP 0699075 A	06/03/96
		HU 73329 A	29/07/96
		HU 9503312 D	00/00/00
		JP 8510746 T	12/11/96
WO 9606637 A1	07/03/96	AU 3410195 A	22/03/96
		US 5648331 A	15/07/97

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/745		A 6 1 K 37/465	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU		
(72)発明者	ハート, チャールズ イー. アメリカ合衆国, ワシントン 98036, ブ ライアー, トゥウェンティファースト ア ベニュー ウェスト 21502		
(72)発明者	ヘッドネル, ウッラ スウェーデン国, エスー216 18 マルモ ェー, カリタスガタン 19		
(72)発明者	ラスムッセン, ミレラ エズバン デンマーク国, デーコー2100 コペンハ ーゲン エー, アビルトガールズガゼー		

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成17年3月10日(2005.3.10)

【公表番号】特表2000-513720(P2000-513720A)

【公表日】平成12年10月17日(2000.10.17)

【出願番号】特願平10-501082

【国際特許分類第7版】

A 6 1 K 38/55

A 6 1 K 31/00

A 6 1 K 38/43

C 0 7 K 14/745

【F I】

A 6 1 K 37/64

A 6 1 K 31/00 6 0 7 A

A 6 1 K 31/00 6 0 9 K

A 6 1 K 31/00 6 0 9

C 0 7 K 14/745

A 6 1 K 37/465

【手続補正書】

【提出日】平成16年6月22日(2004.6.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 手 続 補 正 書

平成16年6月22日

特許庁長官 今 井 康 夫 殿

## 1. 事件の表示

平成10年特許願第501082号

## 2. 補正をする者

名称 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ (外1名)

## 3. 代 理 人

住所 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル

青和特許法律事務所 電話 03-5470-1900

氏名 弁理士(7751) 石 田 敬



## 4. 補正対象書類名

請求の範囲

## 5. 補正対象項目名

請求の範囲

## 6. 補正の内容

請求の範囲を別紙の通りに補正します。

## 7. 添付書類の目録

請求の範囲

1 通

審査  
係

### 請求の範囲

1. 血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する第VII因子を含んで成る、血栓形成を阻害するための、血栓形成に対して敏感な血管部位に局部投与される医薬組成物。

2. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第1項記載の医薬組成物。

3. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第2項記載の医薬組成物。

4. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及び Phe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第3項記載の医薬組成物。

5. 前記血栓形成の部位が手術、顕微手術、血管形成又は外傷に関連している請求の範囲第1～4のいずれか1項記載の医薬組成物。

6. 血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する第VII因子を含んで成る、血管開通性を維持し、又は改良するための、低められた開通性に対して敏感な血管部位に局部投与される医薬組成物。

7. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第6項記載の医薬組成物。

8. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第7項記載の医薬組成物。

9. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及び Phe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第8項記載の医薬組成物。

10. 前記低められた開通性の部位が手術、顕微手術、血管形成又は外傷に関連している請求の範囲第6～9のいずれか1項記載の医薬組成物。

11. 後一虚血性再灌流に関連する心筋損傷を妨げ又は最小にするための組成物の製造のためへの、血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する第VII因子の使用。

12. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第11項記載の使用。

13. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第12項記載の使用。

14. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及び Phe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第13項記載の使用。

15. 前記心筋損傷が、心筋壊死である請求の範囲第11～14のいずれか1項記載の使用。

16. 血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する薬理学的に許容できる第VII因子を含んで成る、後一虚血性再灌流に関連する心筋損傷を妨げ又は最小にするための医薬組成物。

17. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第16項記載の医薬組成物。

18. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第17項記載の医薬組成物。

19. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及び Phe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロ

メチルケトンである請求の範囲第18項記載の医薬組成物。

20. 前記心筋損傷が心筋壊死である請求の範囲第16～19のいずれか1項記載の医薬組成物。

21. 後一虚血性再灌流の間、局部心筋血流を改良するための組成物の製造のためへの、血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する第VII因子の使用。

22. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第21項記載の使用。

23. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第22項記載の使用。

24. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及び Phe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第23項記載の使用。

25. 血漿第X又はIX因子を活性化する修飾された第VII因子の能力を実質的に阻害する少なくとも1つの修飾をその触媒中心に有する薬理学的に許容できる第VII因子を含んで成る、後一虚血性再灌流の間、局部心筋血流を改良するための医薬組成物。

26. 前記修飾がセリンプロテアーゼインヒビターと第VII因子との反応を含んで成る請求の範囲第25項記載の医薬組成物。

27. 前記プロテアーゼインヒビターが、有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン、又はアザペプチドである請求の範囲第26項記載の医薬組成物。

28. 前記プロテアーゼインヒビターが、ダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及び Phe-Phe-Argクロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである請求の範囲第27項記載の医薬組成物。